

N° D'ORDRE :

650

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

M^{me} Hugnette de ROBICHON-SZULMAJSTER

1^{re} THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE GÉNÉTIQUE ET PHYSIOLOGIQUE
DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE CHEZ LA LEVURE

2^e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 18 juin 1960 devant la Commission d'examen :

MM. E. AUBEL	Président
B. EPHRUSSI	} Examinateurs.
J. MONOD	

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553814_0071

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

M^{me} Huguette de ROBICHON-SZULMAJSTER

1^{re} THÈSE

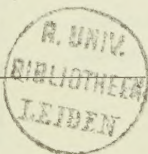
CONTRIBUTION A L'ÉTUDE GÉNÉTIQUE ET PHYSIOLOGIQUE
DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE CHEZ LA LEVURE

2^e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 18 juin 1960 devant la Commission d'examen :

MM. E. AUBEL	Président
B. EPHRUSSI	} Examinateurs.
J. MONOD	



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen..... J. PÉRÈS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	GUINIER	T	Physique des Solides.
DE BROGLIE	T	Théories physiques.	JOST	T	Physiologie comparée.
PRENANT	T	Anatomie et histol. comparées.	FORTET.....	T	Calcul des prob. et physique mathématique.
PÉRÈS	T	Mécanique des fluides et applications.	SCHWARTZ	T	Calc. diff. et Intégr.
BARRABÉ	T	Géologie struct. et Géologie appliquée.	CHOUARD	T	Physiologie végétale.
BOURCART	T	Géogr. physique et Géol. dynamique.	MALAVARD	T	Aviation.
PLANTEFOL	T	Botanique.	BRELOT.....	T	Calcul différentiel.
GRASSÉ	T	Évolution des êtres organisés.	NORMANT	T	Synthèse organique.
PRÉVOST.....	T	Chimie organique.	BENARD	T	Chimie minérale.
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	BUVAT	T	Botanique (E. N. S.).
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.	DUGUÉ	T	Statistiques mathém.
WYART	T	Minéralogie.	GELOSO.....	T	Chimie (S. P. C. N.).
TEISSIER	T	Zoologie.	SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
MANGENOT	T	Biologie végétale.	ULRICH	T	Physiologie végétale.
P. AUGER	T	Physique quantique et relativité.	MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée.
MONNIER	T	Physiologie générale.	KIRRMANN	T	Théories chimiques.
PIVETEAU	T	Paléontologie.	CHADEFAUD	T	Botanique.
ROCART	T	Physique (E. N. S.).	M ^{lle} LE BRETON	T	Physiol. générale.
H. CARTAN	T	Mathématiques (E. N. S.).	SALEM.....	T	Mathématiques générales
LAFFITTE	T	Chimie Générale.	LELONG.....	T	Mathématiques générales.
FAVARD	T	Géométrie supérieure.	DEVILLERS	T	Anatomie et Histol. comparées.
GOULOMB	T	Physique du Globe.	EHRESMANN.....	T	Topologie algébrique.
M ^{lle} COUSIN	T	Biologie animale (S. P. C. N.).	FRANÇON	T	Physique (S. P. C. N.).
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.	GLANGEAUD	T	Géogr. physique et Géologie dynamique.
P. DRACH	T	Zoologie.	GODEMENT.....	T	Mathématiques (M. G. P.).
KASTLER	T	Physique (E. N. S.).	PISOT.....	T	Techniques mathem. de la Physique.
EPHRUSSI	T	Génétique.	ROCH E.	T	Géologie.
WURMSER	T	Biologie physico-chimique.	SCHATZMANN	T	Astrophysique.
RIVIÈRE	T	Géologie (S. P. C. N.) Orsay.	TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique
GAUTHERET	T	Biol. Végétale (P. C. B.).	ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
LUCAS	T	Recherches Physiques.	LENNUIER	T	Physique (M. G. P.).
A. THOMAS	T	Biol. cellulaire.	RIZET	T	Génétique.
ARNULF	T	Optique appliquée.	ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
M. MORAND	T	Enseignement de Physique.	M ^{me} TONNELAT	T	Relativité.
SOLEILLET	T	Physique (P. C. B.).	DIXMIER	T	Mathématiques (M. P. C.).
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.	SOUCHAY	T	Chimie générale.
DANJON	T	Astronomie.	AIGRAIN	T	Électrotechn. générale.
PETIT	T	Biologie maritime.	BRUSSET	T	Chimie minérale.
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.	M. LEVY	T	Physique théorique des hautes énergies.
GALLIEN	T	Embryologie.	M ^{me} CHAIX	T	Chimie biologique.
EICHORN	T	Biologie végétale (S. P. C. N.).	M ^{me} HUREL-PY	T	Biol. vég. (P. C. B.).
DE CUIGNACT	T	Biologie Végétale (S. P. C. N.).	PIAUX	T	Chimie (M. P. C.).
M ^{lle} CAUCHOIS	T	Chimie Physique.	BRUN	T	Mécanique exper. des Fluides.
THELLIER	T	Physique du Globe.	LEDERER	T	Chimie biologique.
L'HÉRITIER	T	Génétique.	M ^{me} DUBREIL	T	Mathématiques.
GRIVET	T	Radioélectricité.	M ^{me} LELONG.....	T	Mathem. (E. N. S.).
PONCIN	T	Mécanique générale.	BELLAIR	T	Géologie (S. P. C. N.).
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.	COTTE	T	Physique (Orsay).
QUELET	T	Chimie organique.	DUBOIS J. E.	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.	LAMOTTE	T	Zoologie (E. N. S.).
CHAMPETIER	T	Chimie macromolécul.	MICHEL André	T	Chimie (S. P. C. N.).
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.	OLMER	T	Énergétique Gle.
JUNG	T	Pétrographie.	ROUALT	T	Physique générale.
THILLAT.....	T	Microscopie et diffract. électronique.	GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
WIEMANN.....	T	Chimie organique et structurale.	BARCHIEWITZ	T	Chimie Physique.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste.	BRUSSEL	T	Physique atomique.
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.	BUSER	T	Physiologie comparée.
DESTOUCHES	T	Théories physiques.	CAMUS	T	Physiol. Vég. (3 ^e Cycle).
PRUVOST	T	Géologie.	CASTAING	T	Physique générale.
AMIEL	T	Chimie générale.	CURIEN	T	Minéralogie et cristallographie.
HOCART	T	Minéralogie.	MOYSE	T	Physiol. Vég. (Orsay).
J. P. MATHIEU	T	Physique (Orsay).	PANNETIER	T	Chimie (S. P. C. N.).
COUTEAUX	T	Biol. animale (P. C. B.).	POSSOMES	T	Zoologie.
MAY	T	Zoologie (Orsay).	PULLMANN	T	Chimie théorique.
CHOQUET	T	Théor. des fonctions et Topologie.	TEILLAC	T	Physique nucléaire et radio activité.
FELDMANN	T	Biol. végétale marine.	TONNELAT	T	Biol. physicochimique.
			VILLE	T	Économétrie.
			WILLEMART	T	Chimie (P. C. B.).
			DODÉ	T	Chimie (S. P. C. N.) Orsay.
			FREYMANN.....	T	Physique générale.
			GUINOCHET	T	Biol. Vég. (Orsay).

ROLLET	T	Chimie (P. C. B.).	CHATELET	Chimie (S. P. C. N.).
M ^{lle} JOSIEN.....	T	Chimie (P. C. B.).	JEAN	Physique Nucléaire et Radio-
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théo-		activité.
		rie des groupes.	MATTLER	Physique (S. P. C. N.).
ARNOULT	T	Electronique.	MICHEL (Louis) ..	Physique théorique des hautes
CHAPELLE	T	Physique (M. P. C.) (Orsay).		énergies.
DELANGE	T	Mathématiques (Orsay).	RUMPF	Chimie (P. C. B.).
DENY	T	Mathématiques (M. G. P.).	BERGERARD	Zoologie (Orsay).
GERMAIN	T	Mécanique théorique des	BERTEIN	Electronique.
		fluides.	BOUSSIÈRES	Chimie des Radioéléments.
LUCAS G.	T	Géologie.	M ^{me} COUTURE ...	Physique (P. C. B.).
ALLARD		Chimie Physique.	ELLENBERGER ...	Géologie Structurale et Géo-
BERTHELOT		Physique Nucléaire et Radio-		logie appliquée.
		activité.	FRANC	Biologie animale.
BRICARD		Météorologie et Physique de	SCHNELL.....	Botanique tropicale.
		l'Atmosphère.	STOLKOWSKI	Physiologie générale.
M ^{me} ALBE-FES-			ACHER	Chimie Biologique (Orsay).
SARD		Psychophysiologie.	BAUDOUIN	Biologie animale (P. C. B.).
FRIEDEL		Physique des Solides.	BEAUMONT	Biologie animale (S. P. C. N.)
M. JULIA		Étude des molécules orga-	BLAMONT	Géophysique Ionosphère.
		niques complexes.	BOURREAU	Biologie Végétale S. P. C. N.
LENDER		Biol. Animale. (S. P. C. N.)		(Orsay).
		(Orsay).	D. CURIE	Physique (M. G. P.).
MAGAT		Physico-chimie des Rayonne-	DURAND-DELGA ..	Géologie.
		ments.	FRÉON	Chimie (P. C. B.).
M ^{lle} QUINTIN	T	Électrochimie.	HELLER	Physiologie végétale.
MONOD	T	Chimie du métabolisme.	TORTRAT	Calcul des Probabilités.
BENOIT	T	Physiologie animale.	CAILLEUX	Géologie (S. P. C. N.).
DE POSSEL	T	Analyse numérique.	MAGNAN	Physique (M. P. C.).
CHARLOT	T	Chimie analytique.	DAUDEL	Mécanique Ondulatoire appli-
HAISSINSKY	T	Radiochimie.		quée à la chimie théorique
LEMÉE	T	Physiologie B. M. P. V.		et à la Physique Nucléaire.
GUÉRIN	T	Chimie M. P. C.		Biologie Végétale (S. P. C. N.)

Secrétaire général C. MONIER

A JACQUES WAJZER

INTRODUCTION À L'ÉPIQUE GÉOMÉTRIQUE ET PRÉSENTATION
DU MÉTAPHYSIQUE DU CALCULUS DES ÉLÉMENTS

PREMIÈRE THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE GÉNÉTIQUE ET PHYSIOLOGIQUE
DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE CHEZ LA LEVURE

Chaque « chose » qui existe représente la matérialisation d'un nombre fini de hasards, mais renferme un nombre infini d'autres hasards qui pourront la perpétuer, la changer, ou la détruire. Sa disparition ou sa survie dépendent de toute façon de l'interférence d'un nombre infini de hasards incontrôlables.

L'expérimentation scientifique a pour but, en limitant le nombre des variables, de permettre — par la juxtaposition de mondes finis, mais infiniment petits — de proposer une image ordonnée d'un Monde qui, par essence, est infini et régi par les seules lois du hasard.

L'entreprise est évidemment vouée à l'échec, mais l'imperfection humaine permet au scientifique de faire semblant de se satisfaire de solutions dont il connaît — mais heureusement, n'est pas a même de mesurer — l'extrême relativité.

Arrivée au terme de ce travail, je prie Monsieur le Professeur Boris EPHRUSSI de bien vouloir trouver ici l'expression de ma profonde gratitude. Son influence sur ma formation scientifique a été décisive et c'est à lui que je dois mon orientation vers l'un des domaines les plus passionnants de la biologie.

Les recherches qui constituent l'objet de cette thèse ont été commencées à l'instigation de Monsieur le Professeur Herman KALICKAR, et ont été en grande partie réalisées dans son laboratoire à Bethesda, USA. Il a bien voulu me faire bénéficier de sa grande connaissance des problèmes de la biochimie moderne. Je suis heureuse de lui témoigner ici toute ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur Eugène AUBEL, qui a bien voulu accepter la présidence du jury de cette thèse, a toujours porté un vif intérêt à mes recherches. Je lui en exprime tous mes remerciements.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Jacques MONOD qui a suivi l'évolution de ce travail avec un intérêt constant et qui a bien voulu accepter de faire partie de mon jury. Ses critiques et suggestions m'ont été des plus utiles.

Je dois beaucoup à Piotr SLONIMSKI. Les discussions fréquentes que nous avons eues, au cours de plusieurs années de travail dans le même laboratoire, m'ont été d'une aide précieuse. Il m'est très agréable d'avoir l'occasion de lui apporter ici un témoignage de ma gratitude et de mon amitié.

La collaboration avec Elisabeth MAXWELL à Bethesda, USA, au cours d'une partie de cette étude, a constitué l'un des moments les plus agréables et les plus intéressants de mon travail de recherche. C'est avec plaisir que je l'assure de ma sincère amitié.

Je n'oublie pas non plus la collaboration amicale et efficace de mes collègues du Laboratoire de Génétique Physiologique et de l'Institut de Biologie. Mes remerciements vont en particulier à Madame Marika SOMLO dont l'aide m'a permis de mener à bien une partie de ce travail.

Enfin, c'est avec une grande joie que je remercie Jean TAVLITZKI pour l'aide qu'il m'a prodiguée avec tant d'efficacité et de gentillesse au cours de la rédaction de ce manuscrit. Qu'il reçoive ici un témoignage de mon amitié.

TABLE DES MATIÈRES

I. INTRODUCTION	19
2. ABRÉVIATIONS.....	22
3. MATÉRIEL ET TECHNIQUES	23
3.1 Matériel biologique : souches	23
3.2 Matériel chimique : produits	24
3.3 Matériel biochimique : enzymes	25
3.4 Milieux de culture : naturels, synthétiques, gélosés ; entretien des souches.....	26
3.5 Méthodes de culture :	
— aérobiose — anaérobiose	27
— mesure de la croissance	27
— récolte, lavage	28
3.6 Méthodes manométriques :	
— suspensions cellulaires	29
— composition des cupules	29
— mesures	29
3.7 Broyats : technique de NOSSAL	29
3.8 Dosage des protéines	30
3.9 Dosages spectrophotométriques :	
— principes	30
— application à chaque enzyme	30
3.10 Dosages à l'aide du ¹⁴ C-galactose :	
— incorporation dans les nucléotides	33
— perméabilité cellulaire	33
3.11 Mesure de la radioactivité : — ¹⁴ C — Tritium	36
3.12 Spectrofluorométrie	36
3.13 Techniques chromatographiques :	
— sur papier	36
— sur colonne	37
3.14 Dosage chimique de DPN	37
3.15 Dosage des 2-déoxysucres	37
3.16 Détermination de la concentration en sulfate d'ammonium	37
4. MÉTABOLISME DU GALACTOSE	37
4.1 Introduction	
— Propriétés, structure, répartition, origine biochimique du galactose ..	38
— « Activation » du galactose ; origine de l'UDPG	40
— Voies métaboliques de l'utilisation du galactose :	
— par la voie métabolique de LÉLOIR	41
— par oxydation directe	42
— Rôles anaboliques de l'UDPG et de l'UDPGal	43
4.2 Mise en évidence des enzymes du métabolisme du galactose chez la levure.	45
— Variations de la teneur en enzymes — Reproductibilité des broyats.	45
— Choix d'une enzyme de référence	45
— Activités des enzymes — Comparaison entre <i>S. fragilis</i> et <i>S. cere-</i> <i>visiae</i>	48
4.3 Métabolisme du 2-déoxy-D-galactose	49
— Métabolisme <i>in vitro</i> : ses étapes successives — Discussion	49
— Métabolisme <i>in vivo</i> : comparaison entre les effets du 2-déoxy-galactose et du 2-déoxy-glucose — Discussion	54
— Résumé	57

4.4	Étude de l'UDPGal-4-épipérase	57
	— Introduction	57
	— Purification de l'enzyme de <i>S. fragilis</i>	58
	— Propriétés de cette enzyme :	
	— Conservation, pII optimum, équilibre	60
	— Effet du PCMB; réactivation par le DPN	62
	— Effet des DP'Nases	64
	— Identification du DPN lié à l'enzyme	64
	— Pureté : poids moléculaire probable	66
4.5	Discussion	69
	— Présentation d'un nouveau mécanisme d'oxydo-réduction, appliqué à l'épimérisation UDPGal-4-UDPG	73
4.6	Résumé	78
5.	CONTRÔLE GÉNÉTIQUE DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE	79
5.1	Introduction	79
	— Capacité de fermenter le galactose	79
	— Ségrégation des caractères concernant le métabolisme des sucres	80
	— Mise en évidence de l'existence d'un gène concernant le caractère «slow».	80
	— Mise en évidence de l'existence de plusieurs gènes complémentaires contrôlant le métabolisme du galactose	81
	— Complémentarité Allélique	83
5.2	Détermination du rôle du gène G ₁	84
	— Caractérisation des enzymes par incorporation du ¹⁴ C-galactose dans les nucléotides uridyliques	84
	— Caractérisation spectrophotométrique des enzymes du métabolisme du galactose chez plusieurs souches de géotypes différents	85
5.3	Détermination du rôle du gène G ₂	85
	— Perméases chez les microorganismes	86
	— Étude de la perméabilité des cellules de levure envers le galactose ..	87
	— Caractéristiques principales du (ou des) système de transport actif du galactose :	
	1) Vitesse de concentration	89
	2) Concentration intracellulaire atteinte	89
	3) Influence de la température	89
	4) Effet du glucose	89
	5) Nature des produits concentrés	89
	— Effet de concentration chez la souche galactose-positve	94
5.4	Discussion	96
	— Rôle du gène G ₁	96
	— Rôle du gène G ₂	96
	— Perméabilité physique et importance physiologique de la galactose-perméase	97
	— Formation et accumulation, à partir du galactose incorporé dans la souche CH-1, d'une substance ayant les propriétés du tréhalose	99
	— Remarques concernant le rôle du gène G ₃	101
	— Contrôle génique des autres réactions du métabolisme du galactose ..	102
5.5	Résumé	102
6.	BIOSYNTHÈSE INDUITE DES ENZYMES DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE	104
6.1	Introduction	104
	— Adaptation enzymatique : généralités	105
	— La formation adaptative de la « galactozymase » chez la levure	108
6.2	Mise en évidence du caractère adaptatif des enzymes du métabolisme du galactose : comparaison entre <i>S. cerevisiae</i> et <i>S. fragilis</i>	110
6.3	Étude de l'induction des enzymes du métabolisme du galactose	111
	— Concentrations inductrices	111
	— Spécificité de l'inducteur	113
6.4	Étude de la période de latence précédant l'adaptation au galactose	113
	— Durée de la période de latence	114
	— Influence d'une source additionnelle d'énergie sur la durée du temps de latence	115
6.5	Étude cinétique de l'adaptation et de quelques facteurs capables de la modifier	117

	17
— Cinétique d'induction de chaque enzyme	117
— Corrélation entre le QO_2 galactose et la teneur en enzymes	119
— Influence d'une source additionnelle d'énergie sur la vitesse de l'adaptation au galactose (AO_2 galactose)	121
— Les enzymes du métabolisme du galactose : biosynthèse induite	122
6.6 Étude comparative des vitesses de biosynthèse de plusieurs enzymes inductibles	123
— Choix du système enzymatique de comparaison	124
— Comparaison de l'effet du tryptophane sur la vitesse de biosynthèse des deux systèmes enzymatiques choisis	125
— Effet du tryptophane sur la quantité totale d'enzymes formées.....	127
6.7 Adaptation en anaérobiose	127
— Cellules non-proliférantes	127
— Cellules proliférantes	129
6.8 Relations existant entre respiration, fermentation aérobie et fermentation anaérobie du galactose	129
6.9 Teneur en enzymes du métabolisme du galactose en rapport avec le mode d'adaptation	132
6.10 Discussion	132
6.11 Résumé	138
7. REMARQUES SUR LE CONTRÔLE GÉNÉTIQUE DE LA FORMATION DES ENZYMES DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE, CHEZ S. CEREVISIAE	139
8. RÉSUMÉ GÉNÉRAL	144

I. — INTRODUCTION

Si les mécanismes présidant à la synthèse protéique sont loin d'être connus, il n'en existe pas moins un postulat commun à toutes les recherches faites dans ce domaine : la synthèse de chaque molécule protéique spécifique requiert un modèle, ou tout au moins un ensemble d'« informations » qui doivent être automatiquement et fidèlement transmises, de génération en génération. Il est évident que les seules entités connues capables de satisfaire ces critères sont les gènes.

La théorie du contrôle héréditaire effectué par les gènes sur les capacités enzymatiques d'une cellule est très ancienne (GARROD, BATESON, 1909 ; BEIJERINCK, 1917). BEADLE et EPHRUSSI lui ont donné en 1936-37 son premier appui expérimental en établissant une corrélation nette entre la formation de substances spécifiques diffusibles aboutissant à la synthèse des pigments des yeux de la *Drosophile* et chacun des gènes impliqués dans cette synthèse. Toutefois, c'est grâce à l'utilisation de micro-organismes capables de croître sur des milieux synthétiques simples et se prêtant à l'expérimentation génétique classique (croisement et étude de la ségrégation des caractères) et grâce à l'isolement à partir de tels microorganismes (*Neurospora*, levures, *E. coli* et salmonelles) ¹ de mutants biochimiques — c'est-à-dire de mutants différant du type sauvage par un besoin nutritif pour une substance chimique définie — que cette théorie a pu progresser et établir ses bases les plus solides.

Chaque fois que l'effet biochimique d'une mutation du type auxotrophique a pû être localisé d'une manière précise, la perte du pouvoir de biosynthèse d'un produit métabolique a été constatée, souvent accompagnée de l'accumulation des produits intermédiaires et de la suppression de l'activité de l'enzyme effectuant la réaction bloquée.

L'isolement de différents mutants nécessitant le même produit final pour leur croissance, mais chez lesquels la mutation se trouve localisée à différentes étapes de la chaîne de biosynthèse, a permis de reconstituer cette chaîne, de caractériser les métabolites intermédiaires et les enzymes effectuant leur transformation.

Dans chacun des nombreux schémas ainsi élucidés, qu'il s'agisse de la biosynthèse de divers acides aminés, vitamines, purines ou pyrimidines, l'absence d'une seule enzyme correspondait à la mutation d'un seul gène. L'existence d'une telle corrélation avait amené BEADLE, dès 1945, à formuler l'hypothèse dite « un gène — un enzyme », laquelle consiste à considérer non seulement que l'action d'un gène s'effectue au niveau de la synthèse des enzymes, mais que la formation de chaque enzyme requiert la participation d'un gène particulier. Un corollaire de cette hypothèse est que la fonction d'un gène réside dans le contrôle de la synthèse d'une seule enzyme.

Grâce aux recherches de BENZER, HARTMAN, LEDERBERG, etc... la structure fine des gènes a pu être établie et de nombreux *loci* divisés en un grand nombre d'unités capables de mutations indépendantes, capables de recombinaisons intragéniques, chacune représentant une unité fonctionnelle déterminée (mutons, recons, cistrons).

L'étude du métabolisme du galactose et de son déterminisme héréditaire s'est jusqu'ici trouvée au centre de différents problèmes, tant biochimiques que génétiques dont l'intérêt ne cesse de s'accroître.

Du point de vue biochimique, la découverte de l'uridine diphospho-galactose et de l'uridine diphosphoglucose (LELOIR, 1951) a apporté l'un des premiers exemples de l'observation qu'un substrat doit être « activé » sous la forme d'une combinaison nucléotidique afin de pouvoir subir certaines transformations métaboliques. En ce qui concerne les sucres, LELOIR a montré que la forme activée est constituée par la liaison d'une molécule d'hexose avec un nucléotide uridylique. Cette découverte a été, par la suite, généralisée à beaucoup d'autres composés. Bien que la signification profonde de ces mécanismes reste encore à élucider, il semble que la formation de dérivés nucléotidiques spécifiques (uridyl- ou guanosyl- pour les composés aldéhydiques, — cytidyl- pour les alcools, -adényl- pour les acides) soit indispensable, aussi bien pour permettre certaines réactions d'interconversion, que pour la formation de molécules plus complexes. L'uridine diphosphogalactose et l'uridine diphosphoglucose constituent les plaques tournantes à partir desquelles d'autres hexoses, des pentoses, des di- et des polysaccharides peuvent être synthétisés (cf. STROMINGER, 1959).

Du point de vue génétique, l'étude du mode de transmission des caractères concernant la capacité d'utiliser le galactose, chez certaines souches de *E. coli*, a apporté une contribution importante à l'étude du phénomène de « transduction », découvert par ZINDER et LEDERBERG, 1952. Ce matériel a, de plus, permis de mettre en évidence l'un des aspects du caractère complexe du contrôle exercé par les gènes sur la synthèse de protéines spécifiques : par exemple, la formation de l'une des enzymes du métabolisme du galactose, la galactose-1-phosphate glucose-1-phosphate uridyltransférase, est déterminée par un « cistron » au sein duquel quatre mutations génétiquement distinctes ont déjà été mises en évidence (MORSE, LEDERBERG et LEDERBERG, 1956 ; KURAHASHI, 1956).

D'autre part, l'étude du métabolisme du galactose chez l'homme a permis d'apporter l'un des rares exemples d'une maladie héréditaire humaine dont l'effet ait pu être localisé au niveau enzymatique : la galactosémie. Cette maladie est due, en effet, à l'absence de l'une des enzymes du métabolisme du galactose : la galactose-1-phosphate/ glucose-1-phosphate uridyltransférase (KALCKAR, ANDERSON et ISSELBACHER, 1956).

C'est l'étude de l'apparition de la capacité de fermenter le galactose chez certaines souches de levures qui a été à l'origine de la découverte de l'« adaptation enzymatique » (DUCLAUX, 1899 ; DIENERT, 1900, puis STEPHENSON et YUDKIN, 1936). Ce phénomène, qui n'a cessé d'être étudié depuis, continue à jouer un rôle capital dans l'étude des mécanismes de régulation métabolique et génétique qui contrôlent la biosynthèse et la spécificité des protéines.

J'ai abordé l'étude du métabolisme du galactose et de son contrôle génétique chez les levures pour les raisons suivantes :

— 1° La présence du système enzymatique assurant dans son ensemble l'isomérisation du galactose en glucose (système LELOIR-KALICKAR), chez les levures, semblait certaine. Il restait toutefois à s'assurer de son importance métabolique, et à savoir, en particulier, s'il existait une autre voie enzymatique conduisant à l'utilisation du galactose chez cet organisme.

— 2° L'existence de deux gènes indépendants, intervenant dans le métabolisme du galactose, chez les levures, avait été montrée (cf. HAWTHORNE, 1956). Il avait été suggéré que l'un de ces deux gènes contrôle la présence de l'une des enzymes du métabolisme du galactose, tandis que l'autre contrôlerait la présence d'un mécanisme de perméabilité au galactose (DOUGLAS et CONDIE, 1952). Toutefois, le rôle de ces gènes n'avait pu être démontré de manière décisive, faute de techniques spécifiques et de connaissances concernant la nature des facteurs responsables de la perméabilité cellulaire. Le troisième gène contrôle un caractère qui est en rapport avec la vitesse d'adaptation au galactose (LINDEGREN, SPIEGELMAN et LINDEGREN, 1944). Le mode d'action de ce gène n'a pas encore été précisé.

— 3° Le caractère adaptatif du complexe enzymatique responsable de la fermentation du galactose (galactozymase) avait fait l'objet de nombreux travaux, mais les composants de ce complexe enzymatique n'avaient jamais été étudiés individuellement et les caractéristiques essentielles de cette adaptation restaient assez confuses. Plusieurs questions demeuraient donc posées :

- a) Le caractère adaptatif s'applique-t-il à toutes les enzymes du système?
- b) S'agit-il d'une synthèse protéique *de novo* de ces enzymes?
- c) Quels sont les facteurs conditionnant leur formation adaptative?

Il a donc semblé intéressant, étant donné les possibilités d'analyse génétique qu'offre la levure pour la continuation ultérieure de l'étude de ce problème, d'entreprendre un travail de clarification sur différents plans, biochimique, génétique et adaptation enzymatique, touchant au métabolisme du galactose chez cet organisme.

Après la description des techniques employées, l'exposé des résultats obtenus au cours de ce travail sera donc divisé en trois parties principales se rapportant chacune à l'un des aspects du problème du métabolisme du galactose chez les levures : biochimie, déterminisme héréditaire et induction des enzymes qui assurent la transformation du galactose en glucose. Chacun de ces trois chapitres principaux sera précédé d'une introduction et suivi d'une discussion détaillée. La présente introduction, ainsi que la discussion finale, seront donc très succinctes.

— A) Au cours de la première partie (chapitre 4), les connaissances actuelles concernant le métabolisme du galactose seront résumées. La présence des enzymes assurant le métabolisme du galactose sera mise en évidence chez plusieurs souches de levures. L'une de ces enzymes, l'uridine-diphospho-galactose-4-épipérase, a été purifiée. La méthode employée et les principales propriétés de cette enzyme seront présentées en détail. L'une des explications possibles du mécanisme de la réaction catalysée par cette enzyme fera l'objet d'une discussion approfondie.

— B) La deuxième partie de cet exposé (chapitre 5) sera consacrée à l'étude du rôle des gènes connus intervenant dans le contrôle du métabolisme du galactose chez les levures. L'état de nos connaissances sur ce sujet ayant été résumé au cours de l'introduction à ce chapitre, il sera montré ensuite que l'un des gènes impliqués contrôle la formation de la galactokinase dans la souche étudiée. La détermination du rôle du second gène n'a été rendue possible que grâce à la mise en évidence d'un

système assurant le transport actif du galactose. Quelques-unes des propriétés de ce système, qui seront exposées en détail, ont permis de l'identifier à une « galactose-perméase ». Il ressort des expériences effectuées au cours de ce travail que la formation de cette galactose-perméase est placée sous le contrôle de ce second gène.

— C) L'étude du caractère adaptatif des enzymes du métabolisme du galactose sera exposée au cours de la troisième partie (chapitre 6). Une brève introduction situera les connaissances acquises concernant la formation induite de la « galactozymase » par rapport aux développements les plus récents de la biosynthèse induite des systèmes mieux connus. Il sera montré que le caractère adaptatif concerne les quatre enzymes assurant le métabolisme du galactose chez la levure, que la formation de ces enzymes est induite par le galactose, selon un mécanisme d'« induction simultanée » et qu'il s'agit, très probablement, d'une biosynthèse *de novo* de ces enzymes. Quelques-uns des facteurs capables d'influer sur la biosynthèse induite de ce système enzymatique seront étudiés.

Cet exposé se terminera par une courte discussion concernant l'ensemble des résultats obtenus et permettant de replacer le problème dans son contexte général.

II. — ABRÉVIATIONS

Les abréviations suivantes seront utilisées au cours de cet exposé :

Gal : D-Galactose

Glu : D-Glucose

DeGal : 2-désoxy-D-galactose

DeGlu : 2-désoxy-D-glucose

Gal-1-P : α -D-Galactose-1-Phosphate

G-1-P : α -D-Glucose-1-Phosphate

G-6-P : Glucose-6-Phosphate

UDPGal : Uridine-diphospho-galactose

UDPG : Uridine-diphospho-glucose

ATP, ADP, UTP, UDP : Adénosine-triphosphate, adénosine-diphosphate, Uridine triphosphate, uridine-diphosphate, respectivement

TPN, DPN : Triphosphopyridine nucléotide, diphosphopyridine nucléotide respectivement

TPNH, DPNH : la forme réduite des deux composés précédents

PP : Pyrophosphate inorganique

UDPGA : Acide uridine-diphospho-galacturonique

Les valeurs des mesures manométriques seront exprimées de la manière suivante :

$Q_{O_2}^{atmosphère}$
 $Q_{O_2}^{étudié}$

L'atmosphère ne sera pas mentionnée lorsqu'il s'agit d'expériences effectuées à l'air.

Q_{O_2} : nombre de mm³ d'oxygène absorbé pendant 1 heure par mg de poids sec de la préparation, dans l'air.

Q_{CO_2} : nombre de mm³ de CO₂ dégagé pendant 1 heure par mg de poids sec de la préparation, dans l'air.

$Q_{CO_2}^{N_2}$: nombre de mm³ de CO₂ dégagé pendant 1 heure par mg de poids de la préparation, dans l'azote.

Q_{CO_2} (ferm.) : nombre de mm³ de CO₂ dégagé pendant 1 heure par mg de poids sec de la préparation, mesuré dans l'air par la méthode du double manomètre (cf. UMBREIT et coll., 1949).

Les valeurs des mesures spectrophotométriques seront exprimées selon la manière classique :

E : extinction = $\log_{10}$ de I_0/I

où I_0 = intensité de la lumière incidente,

I = intensité de la lumière transmise.

Ces extinctions ont toujours été mesurées après traversée d'une couche de 1 cm d'épaisseur de la solution étudiée.

III. — MATÉRIEL ET TECHNIQUES

3.1 MATÉRIEL BIOLOGIQUE.

J'ai utilisé au cours de ce travail les souches de levure suivantes se rattachant à deux espèces : *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces fragilis*.

S. cerevisiae :

1) 59 RT : Souche haploïde, provenant de la collection de M. le Professeur B. EPHRUSSI.

2) B 15 : Souche haploïde provenant du stock de M. le Professeur B. EPHRUSSI (cf. LEUPOLD et HOTTINGER, 1954).

3) 1235-2b : Souche haploïde provenant de la collection de D. C. HAWTHORNE (cf. HAWTHORNE, 1956).

4) 1238-5d : Souche haploïde provenant de la collection de D. C. HAWTHORNE.

5) 1213-4c : Souche haploïde provenant de la collection de D. C. HAWTHORNE.

6) CH-1 : Souche diploïde que j'ai isolée à partir du croisement en masse des deux souches haploïdes 1235-2b $\times$ 1238-5d (cf. LINDEGREN et LINDEGREN, 1943). La suspension cellulaire, contenant des zygotes en nombre important et un excès de cellules haploïdes n'ayant pas copulé a été étalée sur milieu solide (H8) contenant du galactose comme seule source de carbone. Une colonie isolée a été prélevée et mise en suspension dans du Ringer. Une partie de cette suspension a été inoculée dans un milieu liquide (H8, T, galactose). Après culture en aérobiose (24 heures, 28°) un nouvel étalement a été effectué de façon à obtenir 100 à 200 colonies par boîte de Pétri. Le cycle de ces opérations (culture en milieu liquide, étalement sur milieu solide, prélèvement d'une colonie isolée) a été répété six fois. La souche ainsi isolée présente un caractère microscopique très homogène de cellules diploïdes et ses caractères biochimiques (voir partie expérimentale) montrent qu'il s'agit bien du diploïde escompté.

S. fragilis :

1) 10022 : diploïde provenant de l' « American Type Culture Collection ».

3.2 MATÉRIEL CHIMIQUE :

1) *Galactose* : Le galactose utilisé provenait de plusieurs sources (Nutritional Biochemical Corp., Mann, Hoffman La Roche). Il a été utilisé tel quel pour les cultures en milieu naturel. Toutefois, pour certaines cultures en milieu synthétique, et pour toutes les expériences manométriques ou enzymologiques, l'emploi de galactose purifié s'est avéré nécessaire.

Détection des impuretés présentes dans le galactose : par chromatographie dans plusieurs solvants des sucres (voir 3.13) tous les échantillons de galactose commerciaux produisent trois taches, la plus importante étant évidemment due au galactose pur. L'une des taches supplémentaires, variable en importance, correspond, selon les Rf. observés, à du glucose. La troisième tache, toujours faible, semble, d'après les Rf., correspondre à un disaccharide réducteur. Il n'a pas été fait d'effort spécial pour identifier plus précisément ce composé. Il y a lieu, toutefois, de remarquer qu'une souche de levure galactose négative, 59 RT, montre une croissance faible lorsque le galactose non-purifié est employé dans le milieu synthétique H8 galactose et que, parallèlement, non seulement la tache correspondant au glucose, mais également la troisième tache, disparaissent. Au cours d'expériences manométriques, j'ai pu constater que ce composé est fermenté adaptativement par la souche 59 RT. Il se pourrait donc que ce soit du maltose.

Dosage de l'impureté glucose : La quantité de glucose présente est déterminée manométriquement, en mesurant le dégagement total de CO_2 produit par une levure galactose-négative en présence d'une quantité connue de galactose non-purifié. La quantité de glucose présente à l'état d'impureté dans le galactose commercial, ainsi estimée, peut varier entre 0,5 et 5 p. cent selon les échantillons.

Purification du galactose : La purification a été effectuée surtout dans le but d'éliminer le glucose. Les progrès de la purification ont été suivis par la méthode manométrique précédemment indiquée.

La technique de purification finalement adoptée est la suivante : Le galactose (entre 500 g et 2 kg.) est dissout à chaud dans le minimum possible d'eau distillée. La solution sursaturée, souvent très jaune, dont le volume a été mesuré, est mise, après refroidissement, dans un bain à -5° . Deux volumes d'alcool absolu, également refroidis à -5° , sont alors ajoutés rapidement en agitant fortement le mélange. Après une nuit à 0° , une masse visqueuse, retenant une grande partie de la coloration, s'est déposée dans le fond du bécher. La suspension surnageante (contenant des cristaux fins peu abondants) est alors décantée dans un autre bécher. La cristallisation massive est initiée dans ce mélange en frottant énergiquement les parois du bécher avec un agitateur. On laisse la cristallisation se poursuivre encore pendant quelques heures et on filtre sur Büchner. Les cristaux sont ensuite lavés abondamment à l'alcool absolu refroidi, et à l'éther. Le rendement de cette première recristallisation est environ 40-50 p. cent. L'ensemble de ces opérations est répété une seconde fois. Si la solution de galactose ainsi purifiée est encore jaune, on la décolore par addition de Norite, on filtre et on effectue une troisième recristallisation. Le rendement final se situe aux environs de 20 p. cent.

Le galactose purifié par cette méthode, contient au maximum 0,1 p. cent de glucose. Toutefois, la seconde impureté peut encore être décelée par chromatographie sur papier. Mais, étant donné sa faible quantité et l'absence d'interférence

notable avec les déterminations, il n'a pas été essayé de l'éliminer complètement.

2) *Galactose-1-¹⁴C* : Ce produit a été préparé par le Dr. ISBELL, « National Bureau of Standards », USA. Radioactivité spécifique : entre 15 et 20 $\mu\text{C}/\mu\text{mole}$, selon les préparations.

Galactose-¹⁴C-uniformément marqué : Ce produit, provenant du « C. R. A. » a été généreusement offert à l'auteur par M. le Professeur J. MONOD ; radioactivité spécifique : 8 $\mu\text{C}/\mu\text{mole}$.

3) *α -D-Galactose-1-phosphate* : Ce produit a été synthétisé chimiquement selon la méthode de PUTMAN et HASSID, 1957.

4) *Uridine-diphospho-galactose* : Ce produit a été synthétisé enzymatiquement et purifié par chromatographie sur papier, selon la méthode de E. MAXWELL, 1957.

5) *Glucose-1-6-diphosphate* : Ce produit est un cadeau du Dr. LELOIR de Buenos-Ayres.

6) *2-Désoxygalactose* et *2-désoxyglucose* : Les échantillons utilisés au début de ce travail étaient un cadeau du Dr. LANDAU (N. I. H., Bethesda, USA) ; les produits utilisés ultérieurement provenaient des Laboratoires Aldrich, USA.

7) *Les produits suivants* : Uridine-diphosphoglucose, TPN, DPN, ATP, G-1-P, G-6-P, proviennent des maisons PABST ou SIGMA, USA.

8) *L'eau tritiée* (50-100 mC/ml selon les échantillons) : provient de TRACERLAB, USA.

9) *L'azote pur* (< 0,005 p. cent d'O₂) : est la qualité « R » de la maison AIR LIQUIDE, Paris.

10) *DEAE-cellulose* (N-N-diéthylaminoéthylcellulose) : provient de la maison EASTMAN KODACK.

11) *Billes de verre* : Minnesota Mining and Manufacturing Company, St Paul, Minn., USA, n° 150 (95-115 μ).

3.3. MATÉRIEL ENZYMATIQUE.

Plusieurs enzymes, employées comme réactifs dans les tests enzymatiques qui seront décrits plus loin, ont été préparées au laboratoire.

1) *Glucose-6-phosphate-déshydrogénase* : selon la méthode de KORNBERG, 1950.

2) *Phosphoglucomutase* : selon la méthode de NAJJAR, 1948.

3) *UDPG-déshydrogénase* : selon la méthode de STROMINGER et coll., 1957.

4) *UDPGal-4-épimérase de foie de mammifère* : selon la méthode de MAXWELL, 1957.

5) *Gal-1-P/G-1-P-uridylyltransférase* : Selon la méthode de KURAHASHI et ANDERSON, 1958.

6) *Poudre acétonique de foie* (utilisée pour l'extraction de l'UDPG déshydrogénase et de l'UDPGal-4-épimérase) : selon la méthode de HORECKER, 1950.

7) *Extraits bruts* : de mutants de *E. coli* ou de levure (utilisés comme source de Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase ou de galactokinase) : selon la méthode de préparation des extraits décrite plus loin.

D'autres enzymes ont été, soit des produits commerciaux, soit préparés dans d'autres laboratoires.

8) *DPNase de Neurospora* : cadeau de STOLZENBACH, Johns HOPKINS University, USA.

9) *DPNase de Clostridium* : cadeau de E. R. STADTMAN, National Institutes of Health, Bethesda, Md., USA.

10) *Alcool-déshydrogénase* et *Lactico-déshydrogénase cristallines* : ont été achetées chez « Worthington Biochemical Co ».

3.4. MILIEUX DE CULTURE.

Milieux naturels :

Milieu L :

Extrait de Levure DIFCO, 5 g.

Glucose, 30 g.

Eau distillée, q. s. pour 1 litre.

Ce milieu est utilisé pour les précultures effectuées à partir de cultures stock.

Milieu L gélifié, à 25 g. par litre : Ce milieu est utilisé pour l'entretien et la conservation des souches.

Milieu 3S :

a) Extrait de levure DIFCO : 10 g.

KH_2PO_4 : 1 g.

SO_4Am_2 : 1,2 g.

Eau distillée : q. s. pour 1 litre.

b) Glucose : 60 g. par litre.

c) Galactose : 60 g. par litre.

Les solutions, stérilisées séparément, sont mélangées stérilement (1 volume de la solution saline — 1 volume de la solution du sucre désiré) au moment de l'utilisation.

Milieux synthétiques :

Milieu H8 :

a) SO_4Mg : 1,4 g.

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$: 2,0 g.

CaCl_2 0,8 g.

SO_4Am^2 : 7,0 g.

NaCl : 1,0 g.

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,4 g.

Ca Panthoténate : 0,8 g.

Biotine : 0,004 g.

Eau distillée : q. s. pour 1 litre.

Pour éviter toute précipitation, chaque sel est dissout séparément et ajouté à 500 ml d'eau distillée. La solution est alors complétée à 1 litre.

b) Glucose : 60 g par litre.

ou c) Galactose : 60 g par litre.

Les solutions, stérilisées séparément, sont mélangées stérilement, volume à volume, au moment de l'emploi.

Milieux H8 complémentés. — Pour la culture des mutants auxotrophes, le milieu précédent peut être additionné de :

L-Tryptophane, L-Histidine, L-Méthionine, Uracile, séparément ou en combinaisons diverses, à la concentration finale de 100 mg par litre.

Ces composés sont ajoutés stérilement au milieu H8, à partir de solutions à 10 mg/ml, stérilisées indépendamment.

Milieux H8 et H8 complémentés, gélosés : La composition est la même que précédemment, mais 50 g de gélose purifiée DIFCO sont ajoutés à la solution a) avant stérilisation. Les mélanges désirés sont alors effectués avant le refroidissement complet de cette solution.

3.5 MÉTHODES DE CULTURE.

1) *Milieux solides*

Les milieux solides ont été utilisés ici dans le but de déterminer ou de contrôler les marqueurs biochimiques des souches utilisées. Des boîtes de Pétri sont préparées, contenant environ 20 ml des milieux gélosés nécessaires (H8 minimum, H8 complémentés, H8 complet et L). La boîte est partagée en segments et on étale à l'anse une souche par segment à partir d'une suspension fraîchement préparée dans du Ringer d'un prélèvement effectué à l'anse à la surface de la culture stock. Seule une croissance résiduelle est observée en absence du facteur auxotrophique nécessaire à la croissance.

2) *Milieux liquides*

En aérobiose. — Les cultures aérobies, quelle que soit leur taille et le milieu employé, ont toujours été effectuées en fioles d'erlenmeyer, le milieu liquide représentant un dixième de la capacité totale et une bonne aérobiose assurée par agitation mécanique constante dans une étuve ou une chambre à 25°. Lorsque de grandes quantités de levure ont été nécessaires, le nombre de fioles a simplement été multiplié afin d'obtenir la quantité désirée.

En anaérobiose. — Les cultures anaérobies ont été effectuées dans des ballons rodés (cf. STIER et coll., 1950) dont le bouchon contient d'une part un tube allant jusqu'au fond du ballon, pour permettre d'effectuer le barbotage d'azote, et d'autre part, un tube court, relié à une soupape à mercure, permettant, sans rentrée d'air, l'évacuation des gaz résultant de la croissance. Un robinet à trois voies commande le tout. Dans ces ballons, de taille variant entre 200 ml et 3 litres, le milieu liquide représente environ la moitié de la capacité totale. Après inoculation, à partir d'une préculture aérobie, on fait barboter de l'azote « R » à fort débit dans la fiole pendant au moins 40 minutes, la soupape ayant été préalablement munie de mercure, et tous les rodages soigneusement graissés. Le robinet est ensuite fermé de façon à couper le contact avec le milieu extérieur et les fioles transférées dans une étuve ou une chambre à 25° où elles sont agitées mécaniquement.

3) *Mesure de la croissance*

La croissance des cultures en milieu liquide a été suivie par néphélométrie, soit au Beckman à 600 m μ , soit à l'aide de l'électrophotomètre Meunier, en utilisant le filtre jaune dont le maximum de transmission est 546 m μ . Une étude préliminaire

ayant montré que pour les souches employées il y a proportionnalité entre les lectures et la concentration en cellules pour la zone 0,02 à 0,3 unités de Densité optique au Beckman, et entre 10 et 100 divisions arbitraires de l'électrophotomètre Meunier, des dilutions sont effectuées chaque fois qu'il est nécessaire afin que les mesures

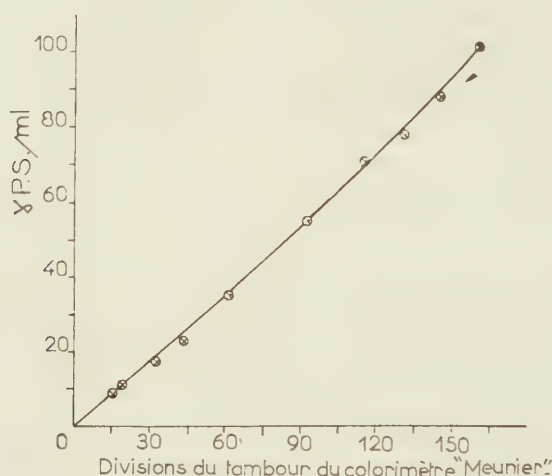


FIG. 1. — Courbe de correspondance entre le poids sec et la densité optique des suspensions de levure.

Les densités optiques sont exprimées en unités arbitraires correspondant aux divisions du tambour du colorimètre de Meunier.

100 divisions (filtre jaune) correspondent à une densité optique de 0,2 (mesurée dans le Beckman à 600 m μ). Un aliquote de chaque suspension ayant servi aux mesures de densité optique, a été ensuite filtré sur un micro ultra-filtre en verre fritté, préalablement taré. Les cellules retenues sur le filtre ont été lavées abondamment puis desséchées à 110°C jusqu'à obtention d'un poids constant.

soient faites dans ces zones de proportionnalité. Si cela est impossible, on se rapporte à une courbe de correspondance, Poids sec/Densité optique, établie expérimentalement, du type de celle reproduite dans la figure 1. Les poids secs ont été déterminés par dessiccation de prises connues d'une suspension de levure, à 110°, dans des récipients tarés, jusqu'à obtention d'un poids constant.

4) Récolte-Lavage

Sauf indication spéciale, les cellules ont été généralement récoltées pendant la dernière génération de la croissance. La taille de l'inoculum et le temps nécessaire à la croissance complète ont été calculés de telle sorte que les cultures soient, en tous cas, maintenues le moins longtemps possible après la fin effective de la croissance. Ceci permet de combiner un bon rendement avec l'obtention de cellules dans un état physiologique satisfaisant et assez comparable d'une expérience à l'autre.

Les cellules sont séparées du milieu de culture par centrifugation et lavées trois fois dans le tube à centrifuger par resuspension dans un volume égal de tampon phosphate 0,1 M, pH 6,0, centrifugation et décantation du liquide surnageant. Les levures sont ensuite suspendues dans un volume du même tampon, calculé de façon à obtenir la concentration en cellules désirée.

3.6 MÉTHODES MANOMÉTRIQUES.

Les mesures manométriques ont été effectuées selon la méthode de WARBURG (cf. DIXON, 1943, et UMBREIT et coll., 1949).

Les cupules ont été utilisées avec un volume liquide total de 2,3 ml. Une prise convenable de la suspension de levures (correspondant à 1 mg de poids sec de cellules) est introduite dans le compartiment principal, le substrat (0,2 ml d'une solution de glucose ou de galactose à 20 p. cent) dans l'un des diverticules latéraux. Les sources additionnelles d'énergie (lactate, glycérol, etc.) ou le tryptophane, selon les concentrations indiquées pour chaque expérience, sont introduits dans le second diverticule latéral : le volume est complété à 2,3 ml par addition de tampon phosphate dans le compartiment principal. Pour les mesures de Q_{O_2} , l'absorption du CO_2 dégagé est assurée par 0,3 ml de potasse à 20 p. cent introduits dans le petit compartiment central. Afin d'en augmenter la surface on y ajoute une bande de papier filtre Durieux, sans cendres, de 1 cm $\times$ 3 cm, pliée en accordéon.

L'anaérobiose est assurée en faisant passer dans les fioles, pendant 15 à 20 minutes, un courant d'azote purifié. Les expériences sont effectuées à 28°, pour des durées variant de 3 à 11 heures. Toutefois, même pour les expériences de longue durée, il a été montré (SŁONIMSKI, 1953) que la contamination bactérienne est négligeable.

3.7 BROYATS.

Les broyats de levure ou de *E. coli* ont été effectués dans l'appareil de NOSSAL (NOSSAL, 1953) de la manière suivante : après lavage des cellules (voir plus haut) la dernière centrifugation est effectuée dans un tube gradué. Le volume du culot peut être ainsi évalué. On y ajoute trois volumes de tampon glycine, pH 7,5, 0,1 M. Les meilleurs résultats ont été obtenus en employant 8 à 9 ml de la suspension épaisse ainsi préparée par tube de l'appareil. Cependant, lorsqu'il n'avait pas été possible d'obtenir une masse cellulaire aussi importante, les volumes ont été diminués jusqu'à 2 ml tout en gardant les mêmes proportions dans la préparation de la suspension. Les tubes de NOSSAL sont refroidis à -30° pendant plusieurs heures avant leur emploi, ainsi que des portions adéquates de billes de verre (95-115 μ de diamètre). A la suspension cellulaire introduite dans le tube refroidi est ajouté un poids égal au volume de cette suspension de billes de verre, également refroidies. Le tube fermé est alors rapidement introduit dans l'appareil (se trouvant dans une chambre froide) et agité pendant 20 secondes. Lorsque des temps supérieurs doivent être employés, les tubes sont refroidis dans un mélange de glace et de sel avant d'être de nouveau agités pour une période de 10 à 20 secondes.

Les temps utilisés ont été :

E. coli : 20 secondes

S. fragilis : 30 secondes.

S. cerevisiae : 45 à 60 secondes.

Examinés au microscope, les broyats ainsi obtenus contiennent très peu de cellules intactes (5 à 10 p. cent), des débris cellulaires et principalement du matériel ne présentant aucune structure.

En quelques secondes la poudre de verre se dépose par décantation. Le liquide surnageant est alors centrifugé à 8000 rpm pendant 20 minutes. Le nouveau liquide

surnaissant obtenu est légèrement coloré en jaune et opalescent. Afin d'éliminer les substrats éventuels et les phosphates (gênant certaines réactions), les extraits bruts sont dialysés pendant 5-6 heures contre plusieurs litres du même tampon ayant servi à leur préparation. Les extraits sont alors congelés et peuvent conserver leur activité pendant au moins deux mois. Après la première décongélation, il est fréquent de constater la présence d'un léger précipité. Celui-ci est éliminé par centrifugation au froid. Les extraits restent ensuite très limpides, même après plusieurs congélations et décongélation successives. C'est donc après la première décongélation que le dosage des protéines est effectué. Ils contiennent 8 à 10 mg de protéines par ml. Pendant les périodes des mesures d'activité enzymatique, les extraits sont conservés dans la glace.

3.8 DOSAGE DES PROTÉINES.

Les protéines ont été déterminées dans les extraits par la méthode de LOWRY et coll. (1951).

3.9 DOSAGES SPECTROPHOTOMÉTRIQUES.

Les mesures spectrophotométriques ont été effectuées dans un appareil de BECKMAN, modèle DU. Afin de pouvoir utiliser le minimum de produits et d'enzymes, j'ai employé des cuvettes de largeur réduite, mais dont l'épaisseur reste de 1 cm et dont le contenu total est de 1 ml. De plus, une plaque perforée d'un petit trou central et introduite dans le passage du faisceau lumineux, permet de réduire ce faisceau et de le concentrer sur la partie centrale de la cuvette. Le volume introduit dans cette dernière peut ainsi être réduit à 0,6 ml. Sauf mention spéciale, tous les dosages spectrophotométriques ont été effectués dans ce volume.

Dans ces conditions, une variation de 1 division Beckman (0,001 unité de Densité optique) correspond à $0,96 \times 10^{-4}$ μ mole de DPNH ou TPNH.

Glucose-6-phosphate déshydrogénase. — Selon la réaction :



On mesure, en présence d'un excès de substrat et d'une quantité limitante d'extrait, la vitesse de réduction du TPN (pH 7,5 ; tampon TRIS ; 340 m μ).

Composition du mélange d'incubation :

Glucose-6-phosphate : 0,5 μ mole.

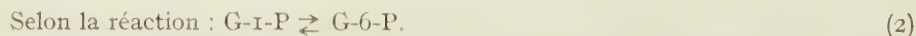
TPN : 0,1 μ mole.

Extrait : quantité limitante.

Tampon TRIS : concentration finale 0,1M, pH 7,5.

Eau : complément à 600 μ l.

Phosphoglucomutase.



En couplant avec la précédente réaction, c'est-à-dire en présence d'un excès de Glucose-6-phosphate déshydrogénase (préparée et cristallisée au laboratoire), de TPN, de glucose-1-phosphate et d'une quantité limitante d'extrait, on mesure la vitesse de réduction du TPN (pH 7,5 ; tampon TRIS ; 340 m μ).

Composition du mélange d'incubation :

Glucose-1-phosphate : 0,5 μ mole

TPN : 0,1 μ mole

Cystéine neutralisée : 6 μ moles

MgCl₂ : 1 μ mole

Glucose-6-phosphate déshydrogénase cristallisée (10 mg/ml) : 10 μ l.

Extrait : quantité limitante

Tampon TRIS : concentration finale 0,1 M, pH 7,5

Eau : complément à 600 μ l.

Gal-1-P / G-1-P uridyltransférase :

Selon la réaction :



En couplant avec les deux enzymes précédentes et en présence d'un excès des deux substrats et de TPN et d'une quantité limitante d'extrait, on mesure la vitesse de réduction du TPN (pH 8, 0; tampon glycine; 340 m μ).

Composition du mélange d'incubation :

Galactose-1-phosphate : 0,2 μ mole

UDPG : 0,16 μ mole

Cystéine neutralisée : 6 μ moles

TPN : 0,1 μ mole

MgCl₂ : 1 μ mole

Extrait : quantité limitante.

Glucose-6-phosphate déshydrogénase cristallisée (10 mg/ml) : 10 μ l

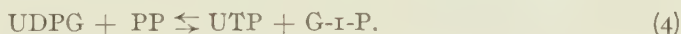
Phosphoglucomutase cristallisée (10 mg/ml) : 10 μ l

Tampon glycine : concentration finale 0,1 M, pH 8,0

Eau : complément à 600 μ l.

G-1-P / P-P uridyltransférase

Selon la réaction :



En couplant avec les réactions (1) et (2), en présence d'un excès des deux substrats et de TPN et d'une quantité limitante d'extrait, on mesure la vitesse de réduction du TPN (pH 8, 0; tampon glycine : 340 m μ).

Composition du mélange d'incubation :

Galactose-1-phosphate : 0,2 μ mole

UDPG : 0,16 μ mole

TPN : 0,1 μ mole

Cystéine neutralisée : 6 μ moles

MgCl₂ : 1 μ mole

Extrait : quantité limitante

Glucose-6-phosphate déshydrogénase cristallisée (10 mg/ml) : 10 μ l

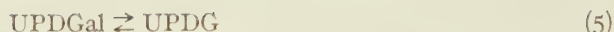
Phosphoglucomutase cristallisée (10 mg/ml) : 10 μ l

Tampon glycine : concentration finale 0,1 M, pH 8,0

Eau : complément à 600 μ l.

UDPGal-4-épimérase.

Selon la réaction :



On couple avec l'enzyme UDPG-déshydrogénase, effectuant la réaction :



et mesure, en présence d'un excès de substrat et de DPN et d'une quantité limitante d'extrait, la vitesse de réduction du DPN (pH 9,0 ; tampon glycine ; 340 m μ).

Composition du mélange d'incubation :

UDPGal : 0,05 μ mole

DPN : 0,1 μ mole

Extrait : quantité limitante

UDPG déshydrogénase purifiée (10 mg/ml): 30 μ l

Tampon glycine : concentration 0,1 M, pH 9,0

Eau : complément à 600 μ l.

Galactokinase.

Selon la réaction : Galactose + ATP $\rightarrow$ Gal-1-P + ADP (7)

Il apparaît au cours de la réaction un radical phosphate ionisable supplémentaire. Le changement de pH qui en résulte peut être suivi par le virage d'un colorant convenable. J. WAJZER (1949) a mis au point une technique de dosage spectrophotométrique de l'hexokinase, basée sur ce principe, en utilisant comme indicateur le rouge de phénol. Dans des conditions bien définies, la diminution d'absorption à 558 m μ (maximum du pic d'absorption de la forme rouge du colorant) est proportionnelle à la quantité de galactose estérifiée. J'ai appliqué cette technique au dosage de la galactokinase dans les extraits bruts. Les extraits doivent être dialysés pour quelques heures contre l'eau distillée afin d'éliminer les substances minérales provoquant un effet tampon (les protéines ne produisent pas d'effet tampon notable dans nos conditions expérimentales). Le dosage est effectué en présence d'un tampon phosphate très dilué (pH 7,55, 0,002 M), afin de diminuer la vitesse des changements de pH observés.

Composition du mélange d'incubation :

Galactose : 2 μ moles

ATP : 2,7 μ moles

MgCl $_2$: 5 μ moles

Extrait : quantité limitante

Phenol sulfone phtaléine Na, pH 7,55 : 0,02 μ mole

Tampon phosphate : concentration finale, 0,002 M, pH 7,55

Eau : complément à 600 μ l.

Dans tous les cas on s'assure (en augmentant ou en diminuant la quantité d'extrait) que la réaction est effectivement limitée par la quantité d'extrait. Des contrôles sont effectués, parallèlement, en absence de substrat et en absence d'extrait, permettant de tenir compte des erreurs apportées, soit par des traces de substrats présentes dans les extraits, soit de réactions parasites, soit d'impuretés présentes dans certains substrats (UDPG dans l'UDPGal, par exemple).

Les figures 2 a, b, c, et d donnent un exemple des cinétiques que l'on obtient en effectuant les dosages d'enzymes de la façon qui vient d'être décrite.

3.10 DOSAGES BASÉS SUR L'INCORPORATION DE GALACTOSE-1-¹⁴C

1) *Incorporation du galactose-1-¹⁴C dans les nucléotides*

MUNCH PETERSEN et coll. (1955) ont mis au point une technique de dosage des nucléotides basée sur l'absorption et l'éluion quantitative sur Norite. Combinée avec l'emploi de produits radioactifs, cette technique permet l'estimation de 10^{-5} μ mole de nucléotide.

Deux réactions précédemment mentionnées, la Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase et l'UDPGal-4-épimérase, utilisent des substrats nucléotidiques. De plus, la réaction de la galactokinase peut être aisément couplée avec un excès de Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase, de façon à ce que le produit mesuré soit sous forme d'un nucléotide. On voit qu'en employant du galactose-1-¹⁴C comme substrat initial, on peut mesurer l'activité de l'une ou de l'autre enzyme, par estimation de la radioactivité incorporée dans la fraction nucléotidique.

J'ai utilisé cette méthode dans les cas où il était intéressant de contrôler des activités très faibles ou nulles pouvant, par les techniques spectrophotométriques précédemment décrites, être confondues avec les faibles activités trouvées dans les contrôles.

2) *Mesure de la perméabilité cellulaire envers le galactose par la pénétration du galactose-1-¹⁴C*

Les cellules lavées (comme précédemment décrit) sont suspendues dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 6,0 de façon à avoir 10 μ l de volume cellulaire total dans 0,1 ml de la suspension.

Le volume cellulaire est calculé conventionnellement sur les bases suivantes :

1 mg P. sec équivaut à 3 μ l de volume cellulaire total (assumant que les levures contiennent en moyenne 33 p. cent de matière sèche et que la densité des levures n'est pas très différente de 1,0).

1 mg de poids sec équivaut à 2 μ l de volume cellulaire interne (admettant que les parois cellulaires représentent, chez la levure, environ 1/3 du volume cellulaire total) (cf. WHITE, 1954). D'autre part, le volume cellulaire aqueux de la levure a été déterminé par LINDBERG et coll. (1949) comme étant égal à 66 p. cent du volume total.

Une prise, correspondant à 1 à 5 μ l de volume cellulaire total est rapidement introduite dans une solution de galactose-¹⁴C tamponnée, (phosphate 0,1 M, pH 6,0), préalablement équilibrée à la température désirée dans un bain thermostatique. Selon les expériences les prises sont effectuées à des temps variant entre 20 secondes et 160 minutes. Les cellules ainsi prélevées sont séparées par filtration ultra-rapide sur membrane « Millipore » (porosité HA) et lavées abondamment sur le filtre avec du tampon phosphate à 0° (cf. BRITTEN et coll., 1955). L'ensemble de l'opération ne dure pas plus de 30 secondes. Un contrôle, effectué avec chaque série de mesures (cellules + mélange radioactif à 0°, immédiatement filtrées et lavées), permet de mesurer la rétention purement mécanique de la membrane filtrante et des cellules.

Galactokinase

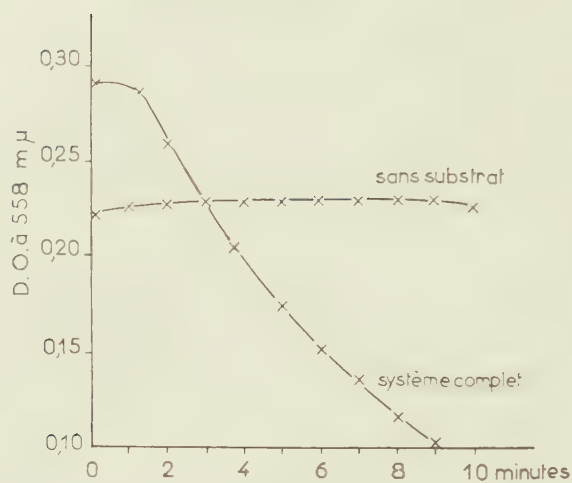


FIG. 2 a

Gal. I.P./G.I.P. uridyltransférase :

cinétique de la réaction

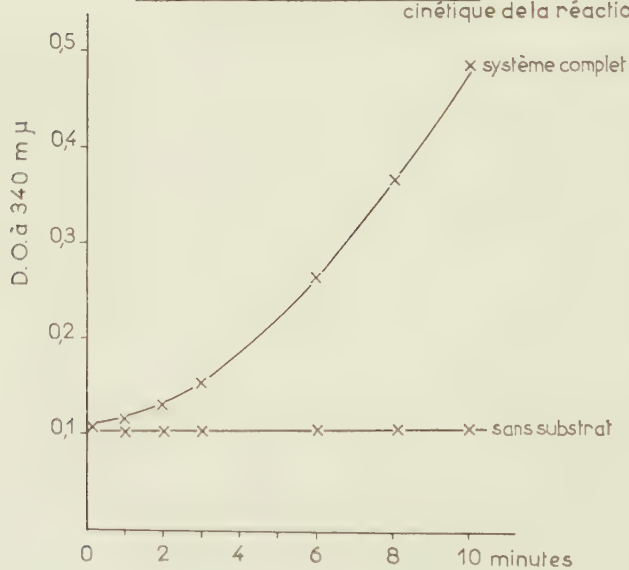


FIG. 2 b.

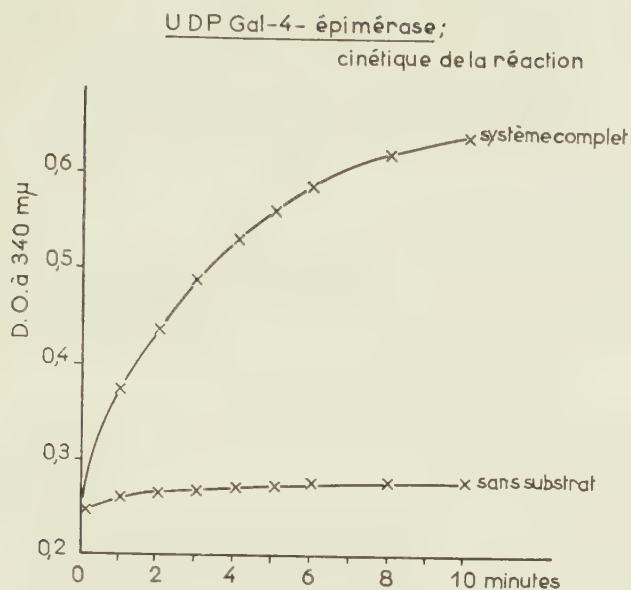


FIG. 2 c.

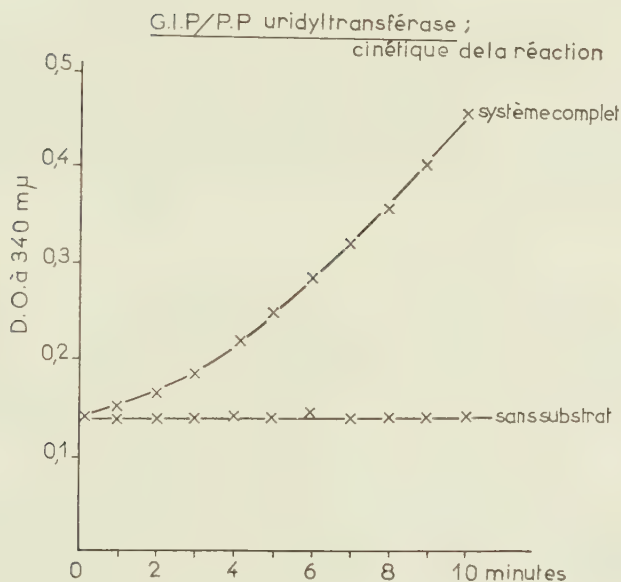


FIG. 2 d.

FIG. 2. — Cinétique des réactions de dosage des enzymes du métabolisme du galactose chez *Saccharomyces cerevisiae* cultivé sur galactose.

Les extraits et les dosages ont été effectués selon les indications portées dans le texte.

Afin d'assurer une grande précision aux mesures, le contrôle ne doit pas dépasser 50 cpm. Lorsque la valeur du contrôle est plus grande, des impuretés présentes dans les solutions utilisées sont généralement à incriminer. En effet, si l'eau distillée est carbonatée, par exemple, un très léger précipité, invisible à l'œil nu, peut se former dans le tampon phosphate, suffisant pour adsorber, à la surface de la membrane de filtration, le galactose radioactif. De tels inconvénients peuvent être évités si l'on prend la précaution de filtrer préalablement sur Millipore toutes les solutions qui seront ensuite utilisées pour les tests.

Lorsque cela est nécessaire la radioactivité incorporée est extraite des cellules collectées à la surface d'un filtre Millipore par ébullition dans l'eau pendant cinq minutes. Le culot est extrait à nouveau et les deux liquides surnageants réunis. On concentre au bain-marie jusqu'à obtention du volume désiré.

3.11 MESURE DE LA RADIOACTIVITÉ

1) ^{14}C : La radioactivité due au carbone 14 a été mesurée avec un compteur à gaz à fenêtre extra-fine, donnant une efficacité de 18 p. cent (pour le carbone), couplée à un passeur automatique d'échantillons et à un enregistreur automatique « précompte ». Deux appareils différents ont été utilisés : « Nuclear » et « Tracerlab ».

Les échantillons solubles étaient étalés sur planchette de cuivre et desséchés par rayonnement infra-rouge. Dans le cas des mesures de perméabilité au galactose- ^{14}C , les filtres « Millipore » étaient collés à l'intérieur d'une planchette et desséchés pendant un temps très court. L'efficacité des comptages est alors de 13 p. 100.

2) *Tritium* : La radioactivité due au Tritium a été mesurée dans un compteur à scintillation en milieu liquide « Packard Instrument Co », type « Tri-Carb ». La solution dans laquelle était effectuée le comptage avait la composition suivante : 8 ml. de toluène (contenant 0,4 g. de diphenyloxazole, 100 ml.), 1,9 ml. d'alcool absolu et 0,1 ml. de la solution aqueuse du matériel dont la radioactivité est à mesurer. Une efficacité d'environ 8 p. cent a été obtenue par cette méthode.

3.12 SPECTROFLUOROMÉTRIE

Les déterminations de fluorescence ont été effectuées dans un spectrofluoromètre enregistreur « Aminco-Bowman » (BOWMAN et coll., 1955).

3.13. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

1) *Chromatographie sur papier*

Trois systèmes de solvants ont été utilisés, soit indépendamment en chromatographie unidimensionnelle, soit en combinaison en chromatographie bidimensionnelle.

— Butanol — Acide Acétique — Eau (4 : 1 : 15) (cf. PARTRIDGE, 1948)

— Pyridine — Acétate d'éthyle — Eau (2 : 2 : 1) (cf. JERMYN et ISHERWOOD, 1949)

— Phénol saturé d'eau (cf. PARTRIDGE, 1948).

La localisation des sucres réducteurs a été obtenue par la méthode au phthalate acide d'aniline (*cf.* PARTRIDGE, 1949).

La présence de composés, même non réducteurs, a pu être détectée par une modification de la méthode classique au Nitrate d'argent, assurant une sensibilité de l'ordre du μg . (ANET et REYNOLDS, 1953). Tous les composés porteurs d'au moins deux hydroxyles voisins réagissent dans ces conditions.

2) Chromatographie des protéines sur colonne de cellulose-DEAE

La technique de PETERSON et SOBER (1956) et de SOBER et coll. (1956) a été utilisée. Cette technique sera décrite en détail dans la partie expérimentale (voir 4.4).

3.14 DOSAGE CHIMIQUE DU DPN

Selon une légère modification de la méthode utilisant la méthyl-éthyl-cétone (CIOTTI et KAPLAN, 1957).

3.15 DOSAGE DES 2-DÉSOXYSUCRES

Selon la microméthode de WARAVDEKAR et SASLAW (1957).

3.16 DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION EN SULFATE D'AMMONIUM

Au cours des préparations enzymatiques, la salinité des solutions a été mesurée en employant un « Purity-Meter » (Barnstead Still and Sterilizer Co). Une très faible quantité, 5 à 20 μl , de la solution à mesurer est diluée dans un grand volume d'eau (250 ml à 1 l.) et la conductibilité de la solution est mesurée. Une courbe étalon, préparée à partir de solutions standards de sulfate d'ammonium diluées dans les mêmes conditions, permet l'estimation très précise de la concentration en sulfate d'ammonium des préparations.

IV. — MÉTABOLISME DU GALACTOSE

Au cours de ce chapitre, les voies métaboliques conduisant à l'utilisation catabolique ou anabolique du galactose seront décrites. L'accent sera mis plus particulièrement sur le système le plus répandu, celui qui est présent chez les levures, *E. coli*, et l'homme.

Les différentes enzymes du métabolisme du galactose seront mises en évidence chez la levure, par les méthodes spécifiques décrites dans la partie technique (3). La reproductibilité des résultats sera étudiée, ainsi que la nécessité de rapporter ceux-ci à une enzyme de référence. Les activités des enzymes du métabolisme du galactose seront comparées chez *S. cerevisiae* et *S. fragilis*.

Dans le cadre de l'étude du métabolisme du galactose chez la levure, il a semblé souhaitable de rechercher l'action d'un composé susceptible de se comporter comme un antimétabolite de ce sucre. Il sera montré que le 2-désoxygalactose peut être métabolisé, *in vitro*, par les enzymes du métabolisme du galactose et qu'il agit, *in*

vitro comme *in vivo*, comme un inhibiteur du métabolisme du galactose. Le « lieu » probable de l'inhibition que produit le 2-désoxygalactose, *in vivo*, sera discuté, ainsi que la possibilité d'utiliser les produits de son métabolisme comme inhibiteurs spécifiques des différentes enzymes du métabolisme du galactose.

L'enzyme catalisant la réaction d'épimérisation, l'UDPGal-4-épimérase, enzyme-cléf du métabolisme du galactose, a fait l'objet d'une attention spéciale. La purification de cette enzyme, à partir de *S. fragilis*, et l'étude de certaines de ses propriétés, seront décrites en détail. Il sera montré que l'enzyme de levure contient du DPN lié, responsable de la fluorescence et indispensable à l'activité de cette enzyme.

Le mécanisme de la réaction catalysée par l'UDPGal-4-épimérase restant encore obscur, les mécanismes qui ont déjà été proposés seront discutés et un mécanisme nouveau d'oxydo-réduction sera présenté.

4.1 INTRODUCTION

C'est à PASTEUR (1856) que nous devons la découverte du galactose. Étudiant l'action des acides sur le « sucre de lait » (que l'on croyait contenir uniquement du glucose), PASTEUR découvrit que le sucre cristallisant après hydrolyse avait un pouvoir rotatoire et des propriétés fermentaires différentes de celles du glucose. En raison de son origine, il nomma ce nouveau monosaccharide « lactose », ce qui a pu, par la suite, prêter à confusion. Toutefois, les propriétés qu'il en a décrites correspondent tout à fait à celles du galactose ($[\alpha]_D = 83^{\circ}$, 2). PASTEUR ne reconnut pas la présence du glucose dans les eaux-mères et ce fut seulement en 1902 que TANRET découvrit la véritable nature du « sucre de lait » (notre « lactose »).

Propriétés :

Il serait superflu de donner ici un historique de nos connaissances sur la chimie du galactose. Le galactose est un aldohexose, réducteur, soluble dans l'eau, à saveur plus sucrée que le glucose. La forme naturelle est dextrogyre et présente un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = + 81^{\circ}$ (valeur finale).

Structure :

La structure attribuée au galactose comme étant la plus probable est représentée dans la figure 3.

Dans cette formule, représentant la structure « en chaise », les liaisons horizontales sont dites équatoriales, c'est-à-dire parallèles au plan ; les liaisons verticales sont dites axiales (les liaisons en trait pointillé ont été prolongées pour la clarté du dessin).

Lorsqu'on construit un modèle moléculaire de ce composé, on s'aperçoit que la plupart des liaisons devraient être en réalité inclinées, non seulement dans le plan, mais aussi dans l'espace. La figure 4 représente le modèle moléculaire « en chaise » du squelette pyranique d'un aldose (selon PIGMAN, 1948). Le noyau en trait accentué est celui de l'oxygène.

Nous verrons plus loin que ces considérations deviennent très importantes lorsqu'il s'agit d'imaginer d'un point de vue stérique les mécanismes possibles d'une réaction enzymatique.

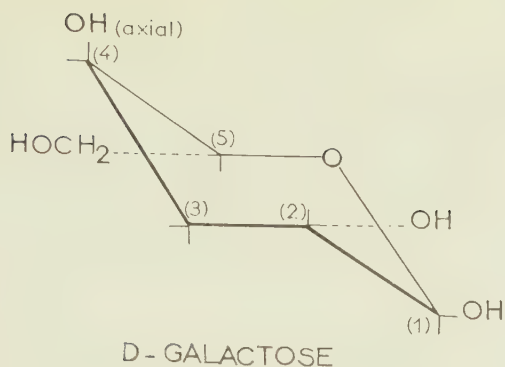


FIG. 3. — *Formule développée du D(+) galactose.*
Les liaisons en traits pointillés ont été prolongées pour la clarté du dessin.

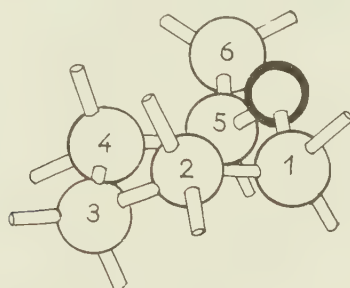


FIG. 4. — *Formule spatiale d'un hexose.*
Selon FIGMAN, 1948 (p. 54).

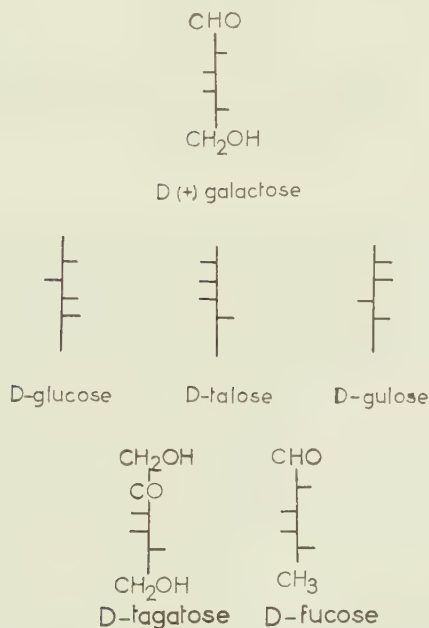


FIG. 5. — *Formules développées de quelques glucides présentant des relations de structure avec le D-galactose.*

Répartition :

On sait que le galactose entre dans la composition de plusieurs composés biologiques importants ; chez les mammifères ce sont les galactolipides du cerveau, le lactose du lait et les mucopolysaccharides des groupes sanguins ; chez les micro-organismes, les polysaccharides de la membrane ; chez les végétaux, les galactanes, le raffinose, le stacchiose et des glycosides, tels que la digitonine, etc.

Origine biochimique :

Les organismes qui viennent d'être mentionnés sont capables d'utiliser le galactose pour leur croissance, mais on n'en connaît, à l'heure actuelle, aucun qui requiert ce sucre pour sa croissance. Il est donc évident qu'il existe chez tous les organismes contenant du galactose, d'une part, une voie métabolique qui permet de le synthétiser, à partir des produits du métabolisme général, et, d'autre part, une voie métabolique qui permet l'utilisation de ce sucre.

Si l'on considère les formules (figure 5), on voit qu'il existe trois aldohexoses qui ne diffèrent du D-galactose que par l'orientation d'un seul hydroxyle : ce sont le D-glucose (4^{ème} hydroxyle), le D-talose (2^{ème} hydroxyle) et le D-gulose (3^{ème} hydroxyle), tous trois « épimères » du galactose. De plus, le D-tagatose est le ceto-hexose et le D-fucose le méthyl-pentose, correspondant au D-galactose.

Étant donné que le talose, le gulose, le D-tagatose et le D-fucose sont, soit des sucres rares, soit des sucres non-naturels, l'hypothèse la plus simple consistait à admettre que l'épimérisation s'effectue à partir de l'hexose le plus répandu dans la nature : le glucose.

Mise en évidence d'un mécanisme d'épimérisation :

C'est à LELOIR et à ses collaborateurs que revient le mérite d'avoir isolé de la levure un composé nucléotidique important, l'uridine-diphospho-glucose (CAPUTTO et coll., 1950) et d'avoir montré qu'une enzyme (présente dans les levures après croissance sur galactose) catalyse la réaction d'équilibre suivante :



Activation :

L'épimérisation du glucose en galactose se produit donc lorsque ces sucres sont liés à un nucléotide uridylique. Jusqu'à présent, cette épimérisation n'a été trouvée pour aucun autre composé du galactose. La formation d'un dérivé nucléotidique (ici UPD-sucre) semble correspondre à un mécanisme dit d'« activation », comme dans beaucoup d'autres cas découverts depuis : GDP-sucres (*cf.* CABIB et coll., 1953, 1954 ; RENAMUS et coll., 1958 ; GINSBURG, 1958), AMP-amino-acides (*cf.* HOAGLAND, 1955), CDP-choline (*cf.* KENNEDY et WEISS, 1954), etc... En d'autres termes, c'est le fait de se trouver liée à un reste nucléotidique qui rend la molécule capable de subir certaines transformations chimiques qu'elle ne peut subir à l'état libre.

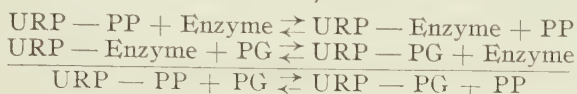
Origine de l'UDPG :

KALCKAR et coll. ont montré que l'UDPG est formé au cours de la réaction d'équilibre suivante (*cf.* KALCKAR et coll., 1952 ; MUNCH-PETERSEN et coll., 1953 ; KALCKAR et coll., 1953 ; MUNCH-PETERSEN et coll., 1955) :



L'enzyme catalysant cette réaction semble être universellement répandue. MUNCH-PETERSEN (1954) a montré à l'aide de pyrophosphate radioactif que le mécanisme de cette réaction consiste en un transfert du groupement uridyde entre le pyrophosphate et le glucose-1-phosphate.

La réaction peut être formulée de la façon suivante :



Si l'on considère l'équation ci-dessus de la droite vers la gauche, la réaction correspond à une pyrophosphorolyse de l'UDPG, ce qui justifie le nom d'UDPG-pyrophosphorylase que les auteurs précédemment cités lui ont attribué. Comme nous le

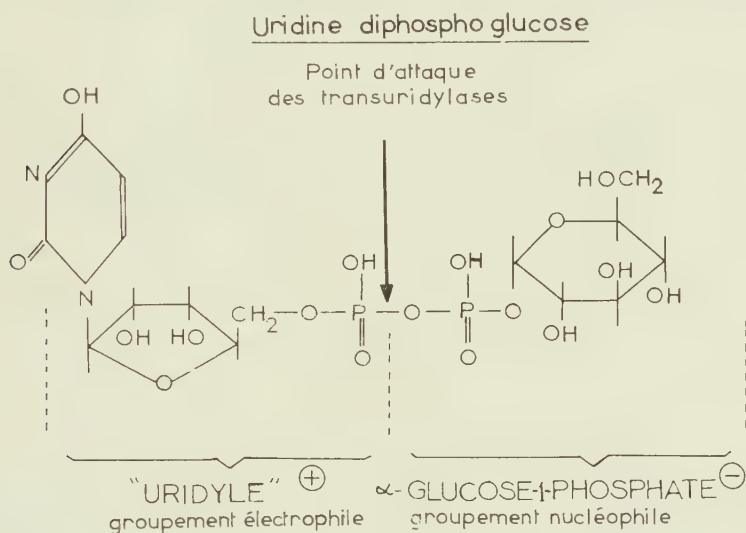


FIG. 6. — Uridine-diphosphoglucose.

verrons plus loin, il existe plusieurs enzymes, de spécificités différentes, mais dont le mécanisme d'action correspond également à un transfert de groupement uridyde entre deux composés nucléophiles. C'est pourquoi j'adopterai ici le nom général d'uridyde-transférase pour cette catégorie d'enzymes, en le faisant précéder, dans chaque cas particulier, du nom des deux composés accepteurs du groupement Uridyde (groupement électrophile). J'appellerai donc l'enzyme précédente la G-1-P/PP uridyde transférase (*cf.* KALCKAR et H. de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1959).

La figure 6 représente à la fois la formule développée de l'uridine diphosphoglucose et le point d'attaque des uridyde-transférases. Le glucose-1-phosphate peut être substitué dans cette formule au pyrophosphate, au galactose-1-phosphate, à différents pentoses phosphates, etc. Le transfert de chacun de ces sucres phosphorylés est catalysé par une enzyme spécifique.

Voies métaboliques conduisant à l'utilisation du galactose :

Je décrirai ici la voie métabolique la plus répandue : phosphorylation, incorporation dans un nucléotide uridylique suivie d'épimérisation. Une autre voie méta-

bolique correspondant à une oxydation directe, mise en évidence par DeLEY et DOUBROFF (1957) n'a jusqu'à présent été trouvée que chez *Pseudomonas saccharophila* (1).

1) *Phosphorylation*. — On sait depuis longtemps (KOSTERLITZ, 1943) que le galactose est phosphorylé par les tissus animaux, en position 1, fournissant ainsi un ester non-réducteur, analogue à l'ester de CORI. La réaction d'estérification est catalysée par une kinase spécifique, la galactokinase, isolée de la levure par TRUCCO et coll., (1948). La réaction, pratiquement irréversible, est la suivante :



Cette réaction a été retrouvée chez *E. coli* (KURAHASHI, 1957) et chez les plantes (HASSID et coll., 1956). Il est intéressant de remarquer que le galactose-1-phosphate est apparemment le seul ester phosphorylé du galactose. L'existence transitoire du galactose-1-6-diphosphate a toutefois été postulée (KLENOW et EMBERLAND, 1955 ; GINSBURG et NEUFELD, 1957).

2) *Incorporation sous forme nucléotidique*. — Connaissant l'existence de l'UDPGal-4-épimérase, précédemment mentionnée, on pouvait postuler l'existence d'une réaction permettant la transformation du galactose-1-phosphate en UDP-galactose, lequel pourrait ensuite être transformé en UDP-glucose. Cette incorporation peut se faire de deux manières :

a) *Par la voie d'une Gal-1-P/PP uridyltransférase*, parallèle à la réaction qui assure la biosynthèse de l'UDPG ($\text{G-1-P} + \text{UTP} \rightleftharpoons \text{UDPG} + \text{PP}$). La réaction est la suivante :



qui peut s'écrire également :



Cette réaction a été mise en évidence chez les plantes (NEUFELD et Coll. 1957). Sa présence a pu également être décelée chez l'homme (ISSELBACHER, 1957). Toutefois, alors que chez les plantes cette réaction fait partie de la principale voie métabolique de l'utilisation du galactose, elle est presque inexistante chez l'homme, et absente chez la levure ou les microorganismes.

b) *Par la voie d'une Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase*. — Cette réaction a pour la première fois été mise en évidence par KALCKAR et coll. (1953), et étudiée par MUNCH-PETERSEN et coll. (1955). Au cours de la réaction catalysée par cette enzyme, le groupement uridyl- se trouve spécifiquement transféré du glucose-1-phosphate au galactose-1-phosphate :



ou, sous une autre forme :

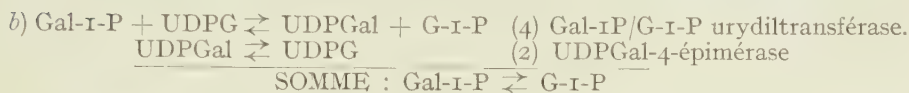
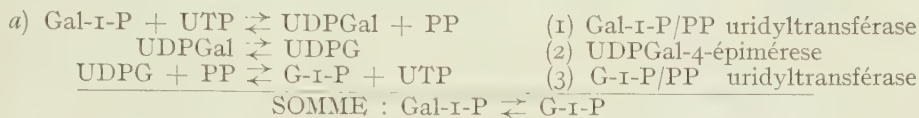


Cette réaction, découverte chez la levure, a été retrouvée dans les hématies (KALCKAR et coll., 1956) et *E. coli* (KURAHASHI et ANDERSON, 1958).

(1) Les principales étapes de cette dégradation sont les suivantes : D-galactose $\xrightarrow{\text{DPN}}$ D-galactono-lactone $\longrightarrow$ D-galactonate $\longrightarrow$ 2-céto-3-désoxy-galactonate $\xrightarrow{\text{ATP}}$ pyruvate + D-glycéraldéhyde-3 phosphate.

3) *Épimérisation*. — L'UDPGal-4-épimérase isolée de *Saccharomyces fragilis* conduit à une valeur d'équilibre dans laquelle 25 p. 100 sont représentés par l'UDPGal, 75 p. 100 par l'UDPG (LELOIR, 1951a). La même valeur d'équilibre a été retrouvée lorsque la même enzyme est extraite de foie de mammifère (MAXWELL, 1957).

4) *Équations générales*. — Les équations précédemment décrites peuvent être résumées ainsi :



Rôles anaboliques du l'UDPG et de l'UDPGal :

Ces deux composés jouent un rôle très important comme donateurs de groupement galactosyl- ou glycosyl- dans la synthèse de di- et de polysaccharides, simples ou complexes. Les principales réactions actuellement connues sont les suivantes :

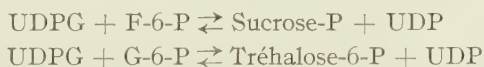
1) *Biosynthèse du lactose* (GANDER et coll., 1956)



Cette réaction n'est probablement pas la seule qui conduise à la formation du lactose (WOOD et coll., 1957). Elle constitue néanmoins une voie importante pour la biosynthèse de ce disaccharide.

2) *Biosynthèse des galactolipides*. — Il existe à l'heure actuelle des indications selon lesquelles les nucléotides uridyliques (UDPG et UDPGal) joueraient tous deux un rôle important dans la biosynthèse des galactolipides par des extraits de cerveau.

3) *Biosynthèse du sucrose et du tréhalose* : — Comme LELOIR et coll. l'ont montré (cf. LELOIR et CABIB, 1953 ; CARDINI et LELOIR, 1955 ; LELOIR et coll., 1955) le sucrose et le tréhalose sont synthétisés à partir de l'UDPG au cours de réactions parallèles :



4) *Biosynthèse de l'acide UDP glucuronique*. — L'acide UDP glucuronique est formé au cours de la réaction suivante :



Cette réaction a été mise en évidence et l'enzyme purifiée à partir de foie de mammifère par STROMINGER et coll. (1957). On sait que cet acide est très important, en particulier dans les processus de détoxication, transport d'hormones telles que la cortisone, thyroxine, etc. (cf. ISSELBACHER et AXELROD, 1955 ; SCHMID et coll., 1957 ; DUTTON et STOREY, 1951 ; SMITH et MILLS, 1954 ; STOREY et DUTTON, 1955). Au cours de ces réactions, l'acide glucuronique se conjugue avec les différents accepteurs, libérant l'UDP, comme dans les réactions précédentes.

Dans les réactions cataboliques les nucléotides n'étaient utilisés qu'en quantités catalytiques. Au contraire, au cours des réactions anaboliques qui viennent d'être

mentionnées, on consomme une molécule d'UDPG par molécule de l'un quelconque des di-saccharides formés. Puisque la synthèse de chaque molécule d'UDPG requiert un molécule d'UTP et que son utilisation libère un molécule d'UDP, il y a donc chute d'énergie, probablement du même ordre de grandeur que celle qui correspond à la transformation de l'ATP en ADP. C'est pourquoi la réversibilité de ces réactions anaboliques est peu probable du point de vue thermodynamique.

On voit que, dans le premier cas, il y a formation stoechiométrique de l'UDPGal, puis de l'UDPG, à partir du Galactose-1-phosphate. L'UDPG et le pyrophosphate, résultant de ces deux réactions, régénèrent — réaction (3) — l'UTP nécessaire à la réaction (1) ; dans le second cas, l'UDPG nécessaire à l'amorçage de la réaction (4) est continuellement reformé par la réaction (2), (voir précédemment, « équations générales »).

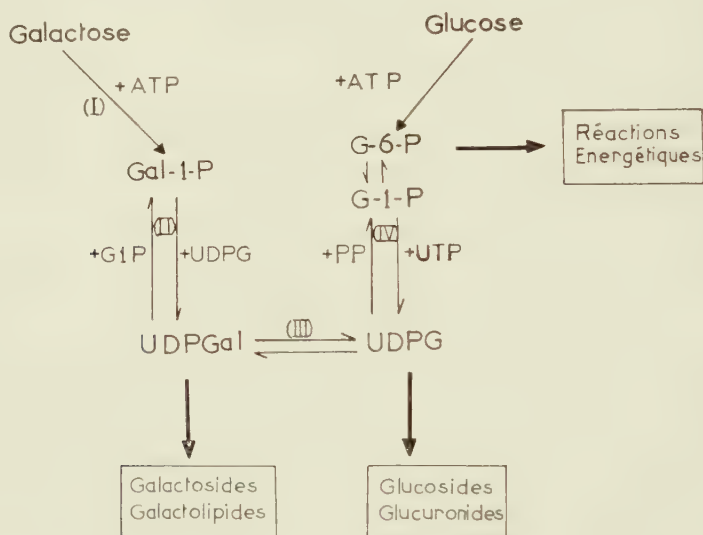


FIG. 7. — Métabolisme du galactose en relation avec celui du glucose, chez la levure, *E. coli*, et l'homme.

Il en résulte que ces deux mécanismes conduisent finalement à la transformation totale du Galactose-1-phosphate en Glucose-1-phosphate, produit métabolique immédiatement utilisable par la cellule. On peut donc considérer qu'au cours de cette transformation catabolique les formes nucléotidiques du glucose (UDPG) ou du galactose (UDPGal), bien que constituant le support réel de l'inversion, n'agissent qu'en tant que coenzymes. Les mécanismes (a) et (b) ne semblent pas coexister au sein d'un même organisme. Le mécanisme (a) étant celui trouvé chez les plantes, tandis que le mécanisme (b) existe chez la levure, *E. coli* et l'homme. Cependant, il est intéressant de remarquer que le mécanisme (a) doit potentiellement exister chez l'homme. En effet, comme ISSELBACHER vient récemment de le montrer (1957), certains des individus chez lesquels l'enzyme (4) est absente par suite d'une mutation, peuvent éventuellement développer une enzyme (1) suffisamment active pour permettre une tolérance accrue envers le galactose.

L'ensemble des réactions qui viennent d'être décrites dans cette introduction, concernant la levure *E. coli* et l'homme, peut être résumé dans le schéma de la figure 7,

4.2. — MISE EN ÉVIDENCE DES ENZYMES DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE CHEZ LA LEVURE

Variation de la teneur en enzymes et reproductibilité des broyats :

Comme je l'ai indiqué dans l'introduction de ce chapitre, les trois enzymes assurant le métabolisme du galactose : galactokinase, Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase, UDPGal-4-épimérase, avaient déjà été caractérisées chez *S. fragilis* (cf. LELOIR, 1951 ; KALCKAR et coll., 1953). Toutefois, les méthodes employées (généralement levures séchées, puis autolysées) ne permettent pas d'avoir une reproductibilité suffisante pour effectuer une étude comparative de la biosynthèse de ces différentes enzymes.

J'ai donc cherché à mettre au point une technique de broyage de la levure (cf. 3.7) suffisamment reproductible et permettant de préserver, autant que possible les activités des enzymes étudiées :

1) *Choix de la méthode de broyage.* — Différentes techniques de broyage ont été essayées : presse de HUGHES (1951), broyeur « TOWERS », broyeur ultra-rapide de NOSSAL (1953). Aucune, toutefois, ne permet de satisfaire à la fois aux critères de rapidité, de facilité d'utilisation, et de préservation des activités enzymatiques. La technique de broyage utilisant l'appareil de NOSSAL a été choisie en raison de sa grande efficacité et de la rapidité de manipulation qu'elle permet : pour obtenir à 80 p. 100 de cellules détruites, il est nécessaire de broyer pendant 40 à 60 minutes dans l'appareil de TOWERS, tandis que 40 à 60 secondes suffisent dans l'appareil de NOSSAL (avec *S. cerevisiae*).

2) *Reproductibilité des résultats.* — L'appareil de NOSSAL est placé dans une chambre froide (de préférence à -15°). Le tube, contenant la quantité de billes de verre nécessaire, est également refroidi à -15° avant d'y ajouter la suspension. Cette dernière est ajoutée au dernier moment ; l'agitation est interrompue chaque 20 secondes. Le tube est alors ramené rapidement au voisinage de 0° en le plongeant dans un bain à -15° , avant de reprendre le broyage.

Au cours d'une préparation effectuée à partir d'une quantité importante de levure (*S. fragilis*) provenant d'une culture unique, les extraits obtenus dans quatre tubes de NOSSAL différents ont été étudiés séparément en ce qui concerne leur teneur en UDPGal-4-épimérase et en G-1-P/PP uridyltransférase. Les résultats de cette expérience sont présentés dans le tableau I.

On voit que la reproductibilité des activités enzymatiques trouvées dans les extraits est très satisfaisante. De plus, si l'on considère les rapports des deux activités (activité d'UDP-Gal-4-épimérase correspondant à 1 000 unités de G-1-P/PP uridyltransférase,) on constate que leur variation est inférieure à 25 p. 100.

3) *Choix d'une enzyme de référence.* — Le volume de la suspension introduite dans le tube de broyage est un facteur critique. En effet, bien que les rendements en protéines restent sensiblement les mêmes, quel que soit le volume utilisé (8 à 12 mg de protéines par ml d'extrait brut, quand les volumes de suspension varient entre 2 et 9 ml), les activités spécifiques obtenues décroissent très rapidement avec le volume de suspension introduite. Ceci peut être attribué à l'échauffement plus grand et à la formation de mousse que l'on constate lorsque les tubes ne sont pas pleins.

La quantité de cellules dont on disposait n'ayant pas toujours permis d'avoir le volume optimum de suspension cellulaire, il a été jugé nécessaire d'exprimer les

TABLEAU I

Reproductibilité des broyats

Les extraits et dosages d'enzymes ont été effectués selon les méthodes décrites dans la partie technique (voir 3.).

Tube	10 ⁻⁴ μ moles de substrat transformé par minute et par mg de protéine		
	UDPGal-4-épimérase	G-1-P/PP uridyltransférase	UDPGal-4-épimérase/ 1 000 U. de G-1-P/PP uridyltransférase
1	385	2 400	160
2	340	2 080	163
3	365	2 320	157
4	400	2 450	163
Moyenne	372	2 312	161
Déviati on par rapport à la moyenne.....	$\pm$ 8,1 %	$\pm$ 5,8 %	$\pm$ 1,9 %

TABLEAU 2

Variati on de la teneur en enzymes dans les extraits provenant de cultures effectuées dans des conditions différentes

Les extraits et dosages d'enzymes ont été effectués selon les méthodes décrites dans la partie technique (voir 3.).

Précultures	Cultures	10 ⁻⁴ μ moles de substrat transformé par minute et par mg de protéine		
		G-6-P déshydrogénase	G-1-P/PP uridyltransférase	G-1-P/PP uridyltransférase/ 1 000 U. de G-6-P déshydrogénase
AE Glu	ANA Gal	2 140	390	182
AE Glu	ANA Gal	1 540	280	182
AE Glu	ANA Gal + Glu	2 310	495 ⁽¹⁾	214
AE Gal	ANA Gal	2 010	465	231 ⁽¹⁾
		2 500 ⁽¹⁾	482	193
		1 950	396	203
		1 380	280	202
		1 780	374	210
		2 340	445	190
		1 560	325	208
Moyenne générale		1 951	393	201
Déviati on		$\pm$ 28 %	$\pm$ 27 %	$\pm$ 12 %
Moyenne AE		1 983	400	202
Moyenne ANA		1 902	383	200
Moyenne galactose		2 075	418	201
Moyenne glucose		1 765	356	202

(1) Les valeurs en italiques sont les plus élevées que les méthodes employées aient permis d'obtenir.

résultats, non seulement en unités d'activité par mg de protéines, mais également par rapport à une enzyme prise comme référence.

Le choix de cette enzyme est assez délicat : sa concentration doit varier le moins possible en fonction du mode de culture ou de l'état physiologique des cellules ; elle doit être suffisamment stable dans les conditions utilisées pour la préparation de l'extrait, et pouvoir être testée d'une manière spécifique et rapide.

Parmi les enzymes qui se trouvent en connection métabolique avec les enzymes du métabolisme du galactose, et font cependant partie de l'équipement enzymatique constant de la cellule, trois répondent, à priori, à ces critères : la G-1-P/PP uridyl-

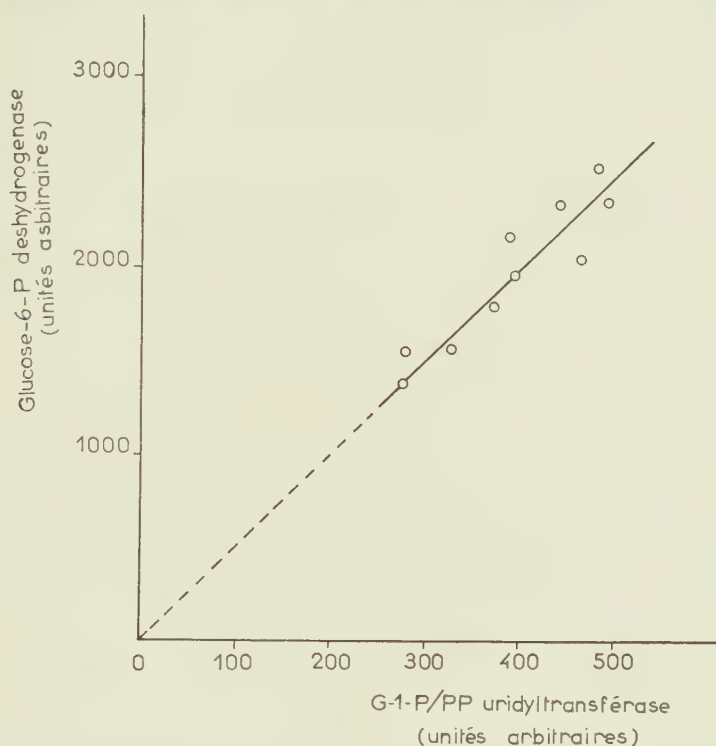


FIG. 8. — Relation entre le contenu des extraits en glucose-6-phosphate déshydrogénase et en glucose-1-phosphate||pyrophosphate uridyltransférase.

transférase, la phosphoglucumutase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase. Toutefois, comme je le montrerai plus loin (6.9), la phosphoglucumutase ne peut être utilisée comme enzyme de référence, car son activité s'accroît lorsque les cellules possèdent les enzymes du métabolisme du galactose.

Afin de juger des variations maxima d'activité des deux autres enzymes, j'ai comparé les activités d'extraits effectués dans les conditions standard (8 ml-8 g de billes de verre), mais provenant de cultures indépendantes et obtenues dans des conditions différentes (aérobiose, anaérobiose, glucose, galactose). La souche utilisée ici a été *S. cerevisiae* CH-1 ; les conditions de culture sont celles qui ont été décrites dans la partie technique (voir 3.5). Les résultats d'une telle comparaison sont consignés dans le tableau 2.

On voit que les différences d'un extrait à l'autre sont beaucoup plus grandes ici que les résultats présentés dans le tableau 1 : + 27-28 p. 100 au lieu de $\pm$ 6-8 p. 100. Il faut donc penser qu'il existe des différences réelles entre les extraits. Le fait que les différences soient seulement diminuées et non abolies lorsqu'on fait le rapport entre les deux activités montre que les variations accidentelles ou systématiques des deux enzymes vont dans le même sens, sans être strictement parallèles, toutefois. Cette corrélation est exprimée clairement dans le diagramme de la figure 8, où sont portées les activités d'une enzyme en fonction de l'autre. De plus, ces différences ne semblent pas pouvoir être mises en relation avec des conditions expérimentales définies telles que aérobiose/anaérobiose, glucose/galactose. En effet, les valeurs obtenues dans ces moyennes partielles ne diffèrent pas significativement de la moyenne générale.

Puisque les variations de la teneur en chacune des deux enzymes G-6-P déshydrogénase et G-1-P/PP uridylyltransférase sont semblables (27 et 28 p. 100) l'une ou l'autre peuvent indifféremment être utilisées comme enzyme de référence. GALZY et SLONIMSKI (1957) ont également constaté que la Glucose-6-Phosphate déshydrogénase est l'enzyme la moins sujette à variation, chez la levure.

Dans les expériences effectuées au début de ce travail, la G-6-P déshydrogénase n'ayant pas été déterminée d'une manière systématique, certains résultats ne pourront être rapportés qu'à une activité constante (1 000 unités) de G-1-P/PP uridylyltransférase. Chaque fois que cela sera possible, les activités seront rapportées à une activité constante de G-6-P déshydrogénase.

Activité des enzymes du métabolisme du galactose chez la levure.

1) *Comparaison des activités chez S. fragilis et S. cerevisiae.* — Pour cette étude les cellules ont été cultivées sur milieu 3S galactose et les activités des enzymes estimées par les méthodes précédemment décrites (voir 3.4, 3.5 et 3.9).

Le tableau 3 donne les valeurs moyennes des activités brutes et rapportées à 1 000 unités de G-1-P/PP uridylyltransférase.

TABLEAU 3
Comparaison entre S. fragilis et S. cerevisiae après culture sur galactose

	10 ⁻⁴ μ moles de substrat transformé par minute et par mg de protéine			
	<i>S. fragilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. fragilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
			Pour 1 000 U. de G-1-P/PP uridylyltransférase	
Galactokinase	1 480	38	725	96
Gal-1-P/G-1-P uridylyltransf.	57 800	178	28 200	450
UPDGal-4-épipimérase	612	97	300	246
G-1-P/PP uridylyltransf. ...	2 040	398	(1 000)	(1 000)

On voit que les résultats obtenus à partir de ces deux espèces de levure sont très différents. Ceci peut être imputé à des causes diverses. (Résistance très différente des membranes, légères différences dans la structure des enzymes impliquées

selon l'organisme considéré, etc.) ou refléter des niveaux intracellulaires réellement différents.

On voit que pour les deux souches, la Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase est la plus active des trois enzymes du métabolisme du galactose, la différence étant toutefois beaucoup plus importante chez *S. fragilis* (40 fois la galactokinase) que chez *S. cerevisiae* (4 fois la galactokinase). La moins active des trois enzymes est l'UDPGal-4-épimérase chez *S. fragilis* et la galactokinase chez *S. cerevisiae*.

2) *Choix de la souche à employer.* — Le fait qu'une plus grande activité enzymatique puisse être obtenue à partir de *S. fragilis* rend cette souche très intéressante lorsqu'il s'agit d'en extraire l'une des enzymes du métabolisme du galactose. C'est pourquoi je l'ai utilisée pour la préparation de l'UDPGal-4-épimérase, par exemple. Mais puisqu'on ne connaît, à l'heure actuelle, de mutants que chez *S. cerevisiae*, j'ai utilisé cette dernière espèce pour les études concernant le contrôle héréditaire et le caractère adaptatif des enzymes du galactose.

4.3. — MÉTABOLISME DU 2-DÉSOXY-D-GALACTOSE

Introduction.

C'est un fait connu que le 2-désoxy-glucose est très rapidement phosphorylé par l'hexokinase (CRAMER et WOODWARD, 1952), et que c'est vraisemblablement le 2-désoxyglucose-6-phosphate accumulé qui est responsable du rôle inhibiteur que cet analogue du glucose exerce sur la fermentation chez les levures (CRAMER et WOODWARD, 1952) et sur la glycolyse de différents tissus (WOODWARD et HUDSON, 1954).

En rapport avec le métabolisme du galactose chez les levures, il était intéressant de voir quel était le sort métabolique du 2-désoxygalactose. Est-il phosphorylé? Est-il métabolisé ultérieurement? Se comporte-t-il comme un inhibiteur de l'une ou de plusieurs des enzymes du métabolisme du galactose? En effet, l'utilisation de ce désoxysucre ou de ses dérivés pourrait être un outil précieux dans l'étude du mécanisme des réactions du métabolisme du galactose et plus particulièrement de celui de l'UDPGal-4-épimérase.

Métabolisme in vitro.

Au moment où j'ai effectué ces expériences, la quantité de 2-désoxygalactose dont je disposais était trop limitée pour entreprendre une détermination chimique des produits du métabolisme de ce composé. J'ai donc dû me limiter à des essais spectrophotométriques. Cependant, étant donné la spécificité des réactions employées, ces essais permettent de se faire une idée assez exacte des transformations métaboliques du 2-désoxygalactose.

Ces essais ont été effectués avec du 2-désoxygalactose synthétisé par le Dr. LANDAU (N. I. H., Bethesda, USA), ne contenant aucune impureté décelable par chromatographie sur papier.

Je décrirai ici une expérience type. Trois expériences semblables ont été effectuées et ont donné des résultats concordants. Ces expériences sont fondées sur les mêmes principes et les mêmes techniques que ceux qui ont été exposés dans la partie

technique (voir 3.6 et 3.9). La figure 9 donne le schéma des opérations successives effectuées à partir du 2-désoxy-galactose.

1) *Phosphorylation du 2-désoxygalactose sous l'influence de la galactokinase.*

Le mélange d'incubation (1) est le suivant :

Désoxygalactose : 50 μ moles

ATP : 44 μ moles

FNa : 75 μ moles

MgCl₂ : 50 μ moles

Cystéine (neutralisée) : 38 μ moles

Extrait purifié *E. coli* 3096 (Gal-1-P/G-1-P-uridylyltransférase négatif) : 1 ml

Tampon TRIS, pH 7,5, 1 M : 0,4 ml

Eau distillée, complément à 3,30 ml

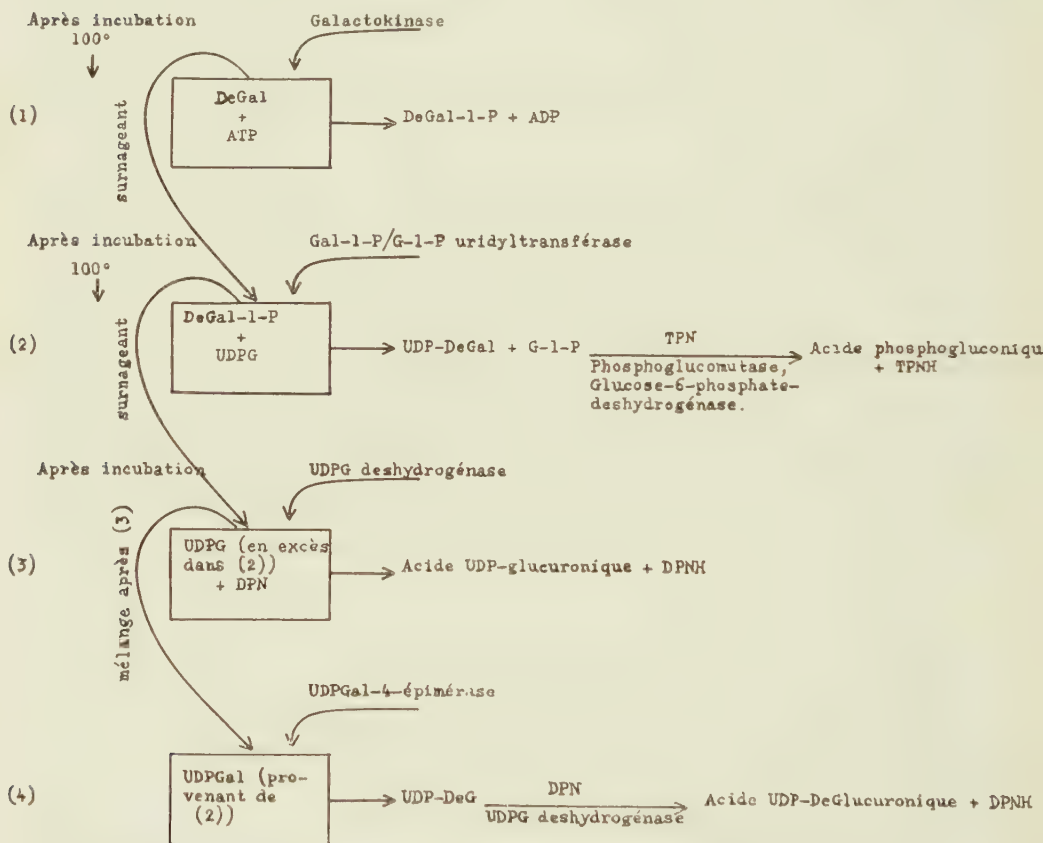


FIG. 9. — Schéma des réactions enzymatiques effectuées *in vitro* à partir du 2-désoxy-D-galactose. Le TPNH ou le DPNH formés au cours de ces réactions ont été mesurés spectrophotométriquement.

L'incubation a été faite à 37°. Après 90 minutes, le mélange a été porté à ébullition pendant trois minutes et centrifugé. Le liquide surnageant est analysé pour son contenu en désoxygalactose-1-phosphate.

2) *Incorporation du 2-désoxygalactose-1-phosphate sous forme d'un nucléotide uridylique.* — (Sous l'influence de la Gal-1-P/G-1-P uridyl-transférase) : Cette étape permet de déterminer la quantité de 2-désoxy-galactose-1-phosphate qui s'est formée au cours de l'incubation précédente, et de savoir si l'enzyme peut effectuer le transfert entre De-Gal-1-P et G-1-P, et transformer quantitativement le désoxygalactose-1-phosphate en uridinediphospho-désoxygalactose.

Afin d'éviter tout apport de galactokinase (qui conduirait à la transformation ultérieure du désoxygalactose demeurant dans le mélange), j'ai utilisé ici un extrait dialysé de levures galactokinase-négatives, contenant la Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase.

La transformation a été suivie spectrophotométriquement sur le mélange réactionnel (2) suivant :

UDPG : 0,075 μ mole

Cystéine (neutralisée) : 2,5 μ moles

TPN : 0,1 μ mole

Liquide surnageant du mélange d'incubation (1) : 100 μ l

Glucose-6-phosphate déshydrogénase (10 mg/ml) : 10 μ l

Phosphoglucomutase (préparation cristallisée, diluée 4 fois), : 10 μ l

Tampon glycolle, pH 9,0, 1 M : 60 μ l

Eau distillée : complément à 600 μ l

La réaction est mise en route par addition de 25 μ l d'extrait dialysé de la souche de *S. cerevisiae* 1245 2b galactokinase-négative. On laisse la réaction se poursuivre jusqu'à valeur constante. Parallèlement, on effectue le même essai sur une cuvette contrôle contenant, à la place du mélange incubé (1), 100 μ l de ce même mélange ayant été inactivé par ébullition au temps 0 de l'incubation 1.

Dans ces conditions, la quantité de TPN réduite au cours du test correspondait à 0,023 μ mole (blanc déduit). Il y avait donc eu, dans le mélange d'incubation (1), 0,759 μ mole de De-Gal-1-P, formé, pendant la durée de l'incubation.

Lorsque le substrat est du galactose, on a observé la formation de 0,573 μ mole de galactose-1-phosphate, au cours d'une incubation de 60 minutes. Le temps d'incubation ayant été ici de 90 minutes on aurait dû s'attendre à trouver 0,800 μ mole de De-Galactose-1-phosphate, si l'enzyme phosphoryle les deux substrats à la même vitesse.

On voit donc que le 2-désoxygalactose semble avoir été phosphorylé par la galactokinase presque aussi effectivement que le galactose. Ceci correspond tout à fait aux résultats obtenus pour la phosphorylation du glucose par l'hexokinase (SOLS et CRANE, 1954). Dans ce dernier cas, bien que le K_m pour le désoxyglucose soit trois fois plus grand que le K_m pour le glucose, les vitesses maxima (à concentration saturante) sont les mêmes pour les deux substrats.

3) *Dosage de l'UDPG en excès.* — Au cours de la réaction précédente il s'est formé de l'UDP-DeGal. Afin d'en doser la quantité formée, ce qui constituera un contrôle de la réaction précédente (la quantité d'UDPDeGal devant être en relation stoechiométrique avec la quantité de DeGal-1-P présente au départ), il est nécessaire d'éliminer l'excès d'UDPG, second substrat de la Gal-1-P/G-1-P uridyl-transférase. Ceci peut être réalisé par la transformation irréversible de l'UDPG en acide UDP-glucuronique sous l'influence de l'UDPG déshydrogénase.

Le mélange d'incubation précédent (2) est porté à ébullition pendant trois

minutes, afin d'inactiver les enzymes, et centrifugé. Une partie aliquote du nouveau liquide surnageant obtenu est transférée dans une cuvette de BECKMAN. On y ajoute de l'UDPG déshydrogénase et du DPN en excès, et on laisse la réaction se poursuivre jusqu'à stabilisation complète. La différence de l'absorption à 340 m μ , entre le début et la fin de la réaction, permet de calculer que la cuvette contrôle contient encore 96 p. 100 de l'UDPG initial. L'extrait de *S. cerevisiae* utilisé ne contenait donc pas d'enzyme contaminant susceptible d'attaquer l'UDPG au cours du test. Ceci montre, de plus, que l'UDPG (et probablement aussi l'UDPGal) est chimiquement stable au cours de l'ébullition dans le mélange réactionnel (2).

Par contre, la cuvette ayant reçu le mélange actif ne contenait plus que 0,036 μ mole d'UDPG. Il y a donc un déficit d'UDPG correspondant à 0,036 μ mole. Une quantité équivalente devrait donc être retrouvée sous forme d'UDP-DeGal dans le test suivant.

4) *Épimérisation de l'UDPDeGal en UDPDeG.* — Sous l'influence de l'UDPGal-4-épimérase) : Dans les cuvettes provenant de l'incubation (3), l'UDPG ayant été quantitativement éliminé, il suffit d'ajouter un excès d'UDPGal-4-épimérase.

Cette réaction s'est montrée positive dans la cuvette expérimentale et nulle dans la cuvette de contrôle. Après stabilisation, il a pu être calculé que cette cuvette contenait 0,029 μ mole d'UDPDeGal. Compte tenu des dilutions, cette quantité correspond à 78 p. 100 du déficit en UDPG constaté dans l'étape précédente (3).

5) *Bilan.* — Le bilan du métabolisme du 2-désoxygalactose, tel qu'il a été mis en évidence par les réactions précédentes s'établit comme suit :

— 2-désoxygalactose phosphorylé	0,759 μ mole
— 2-désoxygalactose transformé en UDPDeGal	0,790 μ mole
— 2-désoxygalactose transformé en UDPDeG	0,594 μ mole

L'évolution spectrophotométrique des réactions qui viennent d'être décrites est représentée dans la figure 10.

b) *Discussion et conclusions des expériences in vitro.* — Ces expériences montrent que :

a) le 2-désoxygalactose est un excellent substrat de la galactokinase puisqu'il est phosphorylé presque aussi rapidement que le galactose ;

b) le désoxygalactose-1-phosphate qui résulte de l'action de la galactokinase peut être quantitativement transformé en UDP-désoxygalactose sous l'action de la Gal-1P/G-1P uridylyltransférase de levure. Ici, le substrat étant facteur limitant, il n'est pas possible de comparer les vitesses maxima, mais la vitesse de la réaction semble très comparable à celle que l'on observe lorsque l'enzyme est testée avec des quantités voisines de galactose-1-phosphate. On peut donc également dire que le désoxygalactose-1-phosphate est un excellent substrat de la Gal-1P/G-1P uridylyltransférase ;

c) l'UDP-Désoxygalactose qui résulte de l'action des deux enzymes précédentes semble également être un substrat de l'UDPGal-4-épimérase. Toutefois, le dosage enzymatique n'a permis de retrouver que 78 p. 100 de la quantité prévue. Ce rendement un peu faible peut évidemment être dû à des pertes au cours des différents transferts. Il est possible, cependant, que ce résultat puisse être expliqué par un effet inhibiteur des produits de la réaction de l'une des deux enzymes impliquées dans

ce dernier test. Dans les conditions employées pour le dosage de l'UDPGal (ici UDPGDeGal), l'UDPG est constamment transformé en acide UDP-glucuronique (ici UDP-DeGlucuronique), lequel s'accumule au cours de la réaction. Une inhibition partielle de l'UDPGal-4-épimérase ne devrait pas empêcher que la transformation en acide UDPDeGlucuronique soit complète. Il est donc plus probable qu'une

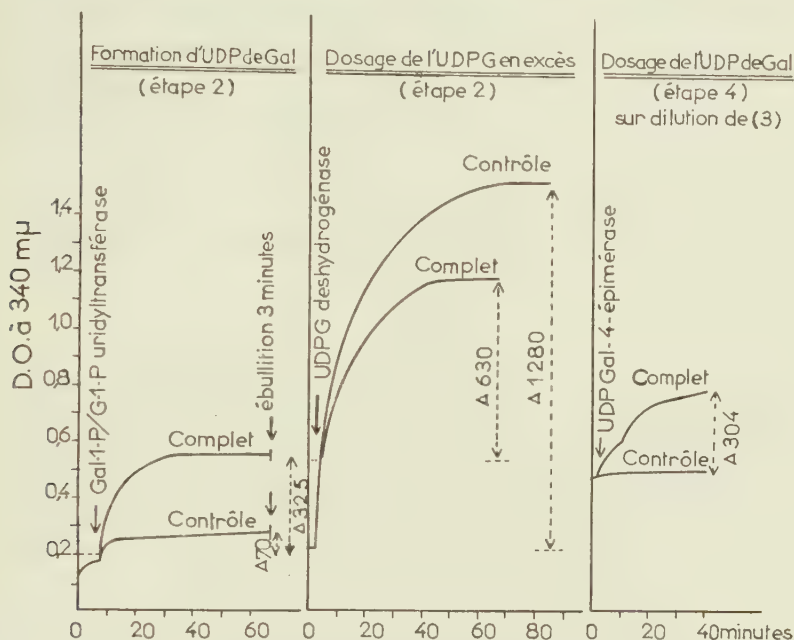


FIG. 10. — Dosage spectrophotométrique des composés formés à partir du 2-désoxy-D-galactose, sous l'action des enzymes du métabolisme du galactose. Se reporter au texte pour la composition des mélanges d'incubation.

éventuelle inhibition s'exerce sur l'UDPG déshydrogénase plutôt que sur l'UDPGal-4-épimérase.

Quoi qu'il en soit, on peut donc raisonnablement conclure que l'UDP-DeGal formé au cours de ces deux premières réactions est épimérisé (au moins à 80 p. 100) en UDP-désoxyglucose.

Inhibition, par le 2-désoxygalactose, du métabolisme in vitro du galactose :

Il ressort de ce qui précède que — le 2-désoxygalactose se comportant comme un substrat des trois enzymes du métabolisme du galactose — on doit s'attendre à ce qu'il se comporte, en présence du galactose, comme un inhibiteur.

Une expérience a été effectuée en ce sens, expérience dont les résultats sont résumés dans le tableau 4. On voit que la transformation du galactose en UDPGal (catalysée par la galactokinase et la Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase) est très fortement inhibée (33,5 p. 100) par la présence d'une concentration équimoléculaire de désoxygalactose. Il a été vérifié, par dosage spécifique des 2-désoxysucres (voir Techniques) que, même dans ce cas, le désoxygalactose est effectivement incorporé

sous forme nucléotidique (dans l'éluat Norite). Il n'a toutefois pas été possible d'étudier en détail le caractère compétitif ou non-compétitif de cette inhibition.

TABLEAU 4

Effet du 2-désoxygalactose sur la formation d'UDPGal à partir de ^{14}C -Galactose

L'incubation a été faite à 37°, 60 minutes à pH 7,5 en présence d'un excès de galactokinase et de Gal-1P/G-1-P uridylyltransférase.

Incubation	Galactose incorporé (10^{-3} μmoles)	Désoxygalactose incorporé (10^{-3} μmoles)
Galactose (1 μmole)	81,2	0
Galactose (1 μmole) + désoxygalactose (1 μmole)	54,0	9,5

Métabolisme in vivo :

Afin de vérifier si les constatations faites *in vitro* pouvaient s'appliquer à la cellule intacte, j'ai effectué quelques expériences ayant pour but de déterminer l'effet du 2-désoxygalactose sur la respiration et la fermentation des levures.

Pour cela, il a semblé intéressant de comparer les effets du 2-désoxy-galactose à ceux du 2-désoxyglucose. En effet, on sait que ce dernier est phosphorylé et qu'il s'accumule sous forme de désoxy-glucose-6-phosphate, qui se comporte, *in vitro*, comme un inhibiteur de la phospho-hexose-isomérase (Wick et coll., 1957), enzyme qui effectue la réaction suivante :



Si le désoxygalactose est capable, *in vivo* comme *in vitro*, d'être transformé en désoxyglucose-1-phosphate, on peut penser qu'il le sera également en désoxyglucose-6-phosphate, sous l'action de la phosphoglucomutase. Son effet inhibiteur devrait, dans ces conditions, s'exercer aussi bien sur le métabolisme du glucose que sur celui du galactose. Si, au contraire, le désoxygalactose n'est pas, *in vivo*, transformé en désoxyglucose-6-phosphate, on peut s'attendre à ce qu'il se comporte, avant tout, comme un inhibiteur du métabolisme du galactose et, seulement secondairement, de celui du glucose.

La figure II résume l'ensemble de ces expériences. Il peut en être retenu que le désoxygalactose exerce sur la respiration du glucose, aussi bien que sur sa fermentation, un effet inhibiteur égal ou même supérieur à celui qu'il exerce sur le métabolisme du galactose, et à celui qu'exerce le 2-désoxyglucose (à la même concentration) sur la respiration ou la fermentation du glucose.

Ces données expérimentales ne permettent pas de faire une analyse comparative détaillée des différentes cinétiques d'inhibition qui semblent être complexes.

Discussion et conclusions des expériences effectuées in vivo :

Comme cela a été montré au cours de l'introduction, le glucose-1-phosphate qui entre dans le métabolisme général, à partir du galactose, provient de l'action de la Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase. L'UDPG provient, au départ, d'un « pool » intracellulaire, maintenu par l'action de la G-1-P/PP uridylyltransférase et, ensuite, de

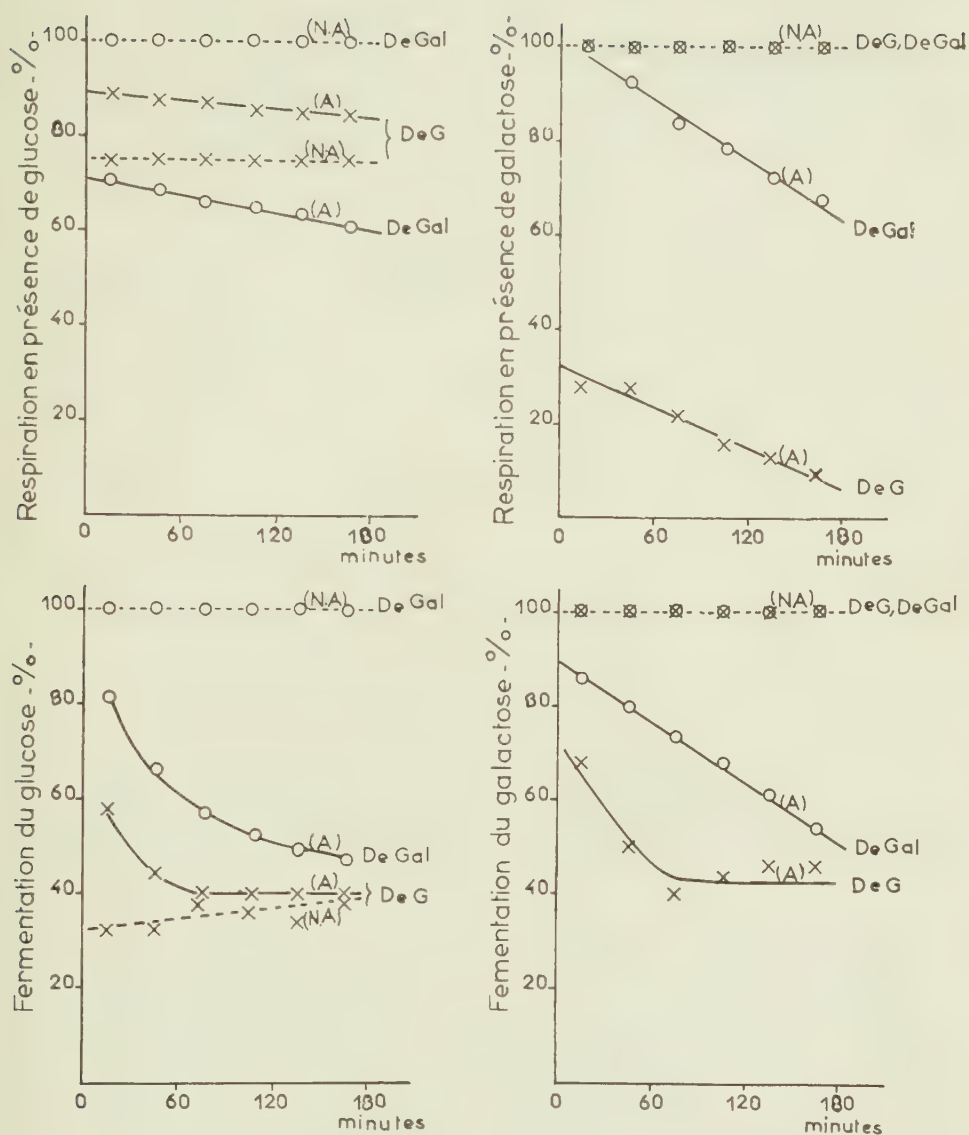


FIG. II. — Effet du 2-désoxy-D-galactose et du 2-désoxy-D-glucose sur l'utilisation aérobie et anaérobie du glucose ou du galactose.

Souche CH-1.

(A) : Cellules adaptées au galactose.

(N. A.) : Cellules non adaptées au galactose.

Glucose, galactose, désoxyglucose et désoxygalactose ont été essayés à la concentration finale de 2 p. 100.

l'hexokinase), a montré une réaction limitée, compatible avec l'attaque du glucose présent comme impureté. Sur cette base, il est possible d'évaluer à 6 p. 100 la contamination du désoxyglucose par le glucose. L'impureté du désoxygalactose n'a pas été mesurée, mais la comparaison de l'importance des taches sur les chromatogrammes permet de l'estimer à environ 10 p. 100. Il est donc possible que les faibles QO_2 observés soient dûs à l'oxydation du glucose ou du galactose, présents à l'état d'impureté, dans ces produits commerciaux.

En tous cas, l'absence de fermentation montre que les désoxysucres ne peuvent être effectivement métabolisés d'une façon complète et que des produits intermédiaires, non métabolisables, s'accumulent.

Ceci correspond aux résultats d'autres auteurs en ce qui concerne le désoxyglucose (cf. LINEWEAVER et BURK, 1934; CRAMER et WOODWARD, 1952; WOODWARD et HUDSON, 1954; WICK et coll., 1957; FRIDHANDLER, 1959).

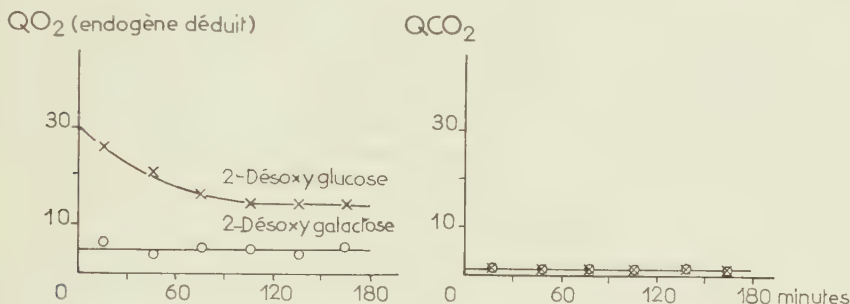


FIG. 13. — *Respiration et fermentation en présence de 2-désoxy-D-glucose et de 2-désoxy-D-galactose.*
Conditions identiques à celles de la figure 11.
Cellules adaptées à l'utilisation du galactose. Souche CH-1.

En résumé, on peut dire que le désoxygalactose est un substrat des enzymes du métabolisme du galactose, ce qui conduit vraisemblablement à sa transformation jusqu'au stade de l'UDP-désoxyglucose. L'étude de l'inhibition produite *in vivo* par le 2-désoxygalactose rend probable sa transformation ultérieure en 2-désoxyglucose-6-phosphate. Son action se trouve ainsi ramenée à celle du 2-désoxyglucose.

Le 2-désoxygalactose étant un substrat des enzymes du métabolisme du galactose et inhibant son utilisation *in vivo* comme *in vitro*, il est probable que des inhibitions de type compétitif avec le galactose pourraient être mises en évidence. Il serait nécessaire de préparer tout d'abord les produits intermédiaires : 2-désoxygalactose-1-phosphate, UDP-désoxygalactose et UDP-désoxyglucose.

Une telle étude permettrait d'obtenir des renseignements sur le mécanisme de certaines des réactions du métabolisme du galactose, et, en particulier, de celui de l'UDPGal-4-épimérase dont il sera question plus loin.

4.4. ÉTUDE DE L'UDPGAL-4-ÉPIMÉRASE.

Introduction :

L'enzyme effectuant l'épimérisation de l'UDPGalactose en UDPGlucose a été caractérisée pour la première fois par LELOIR (1951) chez *Saccharomyces fragilis*. Il nomma cette enzyme « Galactowaldénase », considérant comme le plus probable

un mécanisme reposant sur le principe d'une inversion de WALDEN. L'ELOIR (1951b) retenait cependant plusieurs autres mécanismes : déshydratation-réhydratation, déshydrogénation-réhydrogénation, cyclisation sous forme de L-inositol, selon l'ingénieux schéma suggéré par FISHER (1944).

Aucun des résultats expérimentaux ne permettant à ce moment d'opter pour tel ou tel de ces mécanismes, KALCKAR et MAXWELL (1956) proposèrent une dénomination ne préjugant pas du mécanisme de la réaction : UDPGal-4-épipimérase.

C'est en 1956 que MAXWELL découvrit que l'enzyme, extraite du foie de mammifère, présente, après purification, un besoin absolu pour le DPN (le DPNH étant inhibiteur). D'autre part, KOWALSKI et KOSHLAND (1956) montrèrent que l'enzyme extraite de *Lactobacillus bulgaricus*, ne requiert pas le DPN, mais perd son activité après traitement par la DPNase de *Neurospora*. Bien que ces deux observations contribuent à rendre plus probable un mécanisme d'oxydo-réduction, le mécanisme de la réaction demeure encore obscur.

L'enzyme de levure n'ayant jamais été purifiée, depuis sa mise en évidence par L'ELOIR en 1951, une connaissance plus approfondie de cette enzyme s'imposait. L'étude des propriétés de cette enzyme, extraite d'un organisme différent des deux précédents, permettrait de les comparer, et peut-être d'en tirer des renseignements plus précis concernant le mécanisme de la réaction d'épipimérisation.

Purification et propriétés de l'UDPGal-4-épipimérase de levure :

Une première méthode de préparation a permis d'obtenir l'enzyme suffisamment purifiée (environ 80 fois). Il a été ainsi possible d'en déterminer les propriétés essentielles ; en particulier, l'enzyme possède une fluorescence caractéristique, ne montre pas d'exigence pour le DPN et n'est pas inhibée par le DPNH. L'élimination du composé responsable de la fluorescence de l'enzyme, par traitement par PCMB, DPNase, ou simplement vieillissement, a conduit à sa transformation en une enzyme semblable à l'enzyme de foie, c'est-à-dire non fluorescente, exigeant le DPN et inhibée par le DPNH. De même que l'enzyme de foie, l'enzyme de levure traitée n'incorpore pas le tritium à partir d'eau tritiée ou de DPNH tritié (MAXWELL, de ROBICHON-SZULMAJSTER et KALCKAR, 1958).

Une purification plus poussée (environ 150 fois) a permis de confirmer l'ensemble de ces propriétés, de déterminer par trois méthodes indépendantes que le composé responsable de la fluorescence de l'enzyme est le DPN et de mettre en évidence la corrélation étroite existant entre activité enzymatique, fluorescence et contenu en DPN (MAXWELL et de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1960).

Je décrirai ici une préparation type, obtenue selon la seconde méthode, en faisant ressortir les différences principales avec la première méthode. Toutefois, les expériences concernant la détermination des propriétés de l'enzyme seront empruntées au matériel obtenu par l'une ou l'autre méthode, selon le cas.

A) Purification de l'enzyme :

1) *Obtention des cellules.* — 12 erlenmeyers de 6.l contenant 1500 ml de milieu 3S-galactose ont étéensemencés avec 100 ml d'une préculture de 24 heures de *S. fragilis*, effectuée dans le même milieu. Les erlens étaient fortement agités, à 28°, pen-

dant 24 heures. Les cellules, récoltées par centrifugation dans une centrifugeuse Sharpless, ont été lavées (dans la Sharpless), par passage d'un volume d'eau distillée égal au volume de la culture.

2) *Préparation des extraits.* — Le culot cellulaire (310 g poids humide) a été suspendu dans 1 litre de tampon glycolle, 0,1 M, pH 6,5, et broyé, par portions de 9 ml. dans un appareil de NOSSAL, selon les conditions habituelles (voir 3.7). Après élimination des billes de verre et centrifugation de l'extrait à grande vitesse (Lourdes, modèle SL), le volume du liquide surnageant était de 590 ml, et contenait 3,2 g de protéines.

3) *Elimination des acides nucléiques.* — Alors que dans la première méthode de préparation les acides nucléiques avaient été éliminés par précipitation à l'aide de Cl_2Mn (0,05 M, concentration finale), nous avons utilisé ici un procédé suggéré par P. BERG et W. E. RAZZEL (communication personnelle), consistant en une digestion autolytique des acides nucléiques : l'extrait a été additionné de 60 ml de tampon $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}-\text{PO}_4\text{HK}_2$, 1 M pH 7,0, et le mélange incubé à 37° pendant deux heures. L'examen des rapports d'extinction 260 m μ /280 m μ a montré que ce procédé conduit, dans notre cas, à l'élimination quasi-complète des acides nucléiques. De plus, aucune perte d'activité n'a lieu pendant le traitement.

A ce stade la préparation a été conservée congelée pour la nuit. Toutes les opérations ultérieures ont été effectuées entre 0 et +4°.

4) *Précipitation par le sulfate d'ammonium de la fraction « 0-50 p. cent saturation »* (I). — La solution a été amenée à 50 p. 100 de saturation par addition lente de 175 g de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ solide. Le précipité obtenu a été centrifugé et redissous dans 15 ml d'eau distillée.

5) *Précipitation par le sulfate d'ammonium de la fraction « 35-50 p. cent saturation »* (II). — La concentration en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ dans le précipité redissous était 9 p. 100 saturation (voir 3.15). La solution a été additionnée de 13,9 g de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, le précipité centrifugé et éliminé. Au nouveau liquide surnageant, 8,7 g de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ont alors été ajoutés. Toutes ces additions sont effectuées très lentement, par petites portions. Ce dernier précipité a été centrifugé et redissous dans 15 ml d'eau distillée.

6) *Dialyse.* — Préalablement au passage sur colonne de cellulose il est nécessaire de réduire au maximum la concentration en sels de la solution protéique. Au cours des précédentes préparations, la dialyse faite contre l'eau distillée, provoquait une perte d'activité variant entre 30 et 50 p. 100. Étant donné certaines des propriétés de l'enzyme (sensibilité au PCMB, protection par la cystéine), nous avons effectué la dialyse contre de l'eau distillée additionnée de mercaptoéthanol (0,25 ml par litre d'eau), pendant 2 h. 30. Dans ces conditions, aucune perte d'activité n'a eu lieu au cours de la dialyse.

La solution, après dialyse, contenait 225 mg de protéines (dans 15 ml).

7) *Chromatographie sur colonne de cellulose DEAE.* — La colonne employée avait 2,5 cm de diamètre et contenait 5 g de cellulose-DEAE, préalablement lavée par l'eau distillée (sur colonne), jusqu'à ce que le liquide d'élution présente une absorption nulle dans la région 260-280 m μ .

Dans la première méthode de purification, nous avons effectué l'élution à l'aide d'un gradient de ClNa allant de 0,1 M à 1 M. Une importante amélioration a été obtenue en employant, dans la deuxième méthode, un gradient mixte : ClNa -pH. A cet effet, le récipient mélangeur recevait 500 ml d'une solution de tampon glycy-

glycine, pH 6,0, 0,05 M, rendue 0,5 M en NaCl ; le récipient réservoir recevait alors 500 ml de tampon glyco-colle, pH 9,0, 0,05 M, rendu 0,6 M en NaCl (les deux tampons ont été ajustés au pH désiré par addition de NaOH).

Avant d'effectuer le dépôt de la solution protéique sur la colonne, une petite quantité d'une solution identique à celle du récipient mélangeur est passée au travers de la colonne, aux fins d'équilibration. La solution protéique est alors déposée à la surface de la cellulose ; on attend que son absorption soit complète. La colonne est ensuite connectée avec le récipient mélangeur et ce dernier mis en relation avec le récipient réservoir. La vitesse d'écoulement était réglée aux environs de 1,5 ml par minute. Des fractions de 10 ml ont été collectées.

Les fractions ont été examinées individuellement pour leur fluorescence (voir plus loin, résultats). Les fractions contenant le pic possédant la fluorescence caractéristique de l'épimérase ⁽¹⁾ (tubes 35 à 50) ont été réunies.

8) *Lyophilisation*. — Les fractions réunies, représentant un volume de 170 ml, ont été concentrées par lyophilisation jusqu'à un volume de 45 ml.

9) *Précipitation par le sulfate d'ammonium de la fraction 0-75 p. 100 saturation* » (III). — 140 ml d'une solution saturée de sulfate d'ammonium ont été ajoutés à la solution lyophilisée précédente. Le précipité résultant a été centrifugé et redissous dans 6 ml de tampon glycyl-glycine, 0,25 M, pH 7,5.

Cette solution contenait toute l'activité présente dans l'extrait brut et ne contenait plus que 21 mg de protéines.

Le tableau 5 permet de suivre la purification au cours des principales étapes de la préparation décrite ci-dessus. On voit qu'elle aboutit à une purification finale de 150 fois, tout en permettant une récupération totale de l'activité.

A ce stade de purification l'enzyme de levure a une activité spécifique cinq fois plus élevée que l'enzyme de foie.

TABLEAU 5

Purification de l'UDPGal-4-épimérase de Saccharomyces fragilis (voir texte)

Fraction	Unités	Activité spécifique (Unités/mg protéines $\times 10^{-3}$)
Extrait brut.....	22×10^5	0,5
Sulfate d'ammonium I	16×10^5 ⁽¹⁾	1,8
Sulfate d'ammonium II	17×10^5 ⁽¹⁾	7,1
Eluat DEAE-cellulose	23×10^5	50
Sulfate d'ammonium III.....	22×10^5	75

⁽¹⁾ L'activité de l'enzyme est inhibée par le sulfate d'ammonium.

B) Propriétés de l'enzyme

1) *Conservation*. — L'enzyme purifiée peut être conservée à -20° , soit en solution stable dans le tampon glycyl-glycine pH 7,5, soit à l'état de poudre lyophilisée, sans perte d'activité pendant au moins deux mois.

⁽¹⁾ Étant donné la corrélation étroite déjà observée au cours des précédentes préparations entre activité et fluorescence, il n'était pas nécessaire de mesurer individuellement l'activité enzymatique des fractions.

2) *pH optimum*. — De même que l'enzyme de foie, l'épimérase de levure a un très large optimum de pH situé entre 8,0 et 9,5.

3) *Equilibre*. — A l'équilibre, le rapport UDPG/UDPGal est de 3/1, ce qui est en accord avec les données de LELOIR (1951) sur l'enzyme de levure, et de MAXWELL (1956) sur l'enzyme de foie.



FIG. 14. — Spectre de fluorescence des extraits semi-purifiés provenant de cultures de *Saccharomyces fragilis* adaptée (galactose) et non-adaptée (glucose). Les conditions expérimentales sont décrites dans le texte.

4) *Fluorescence*. — Des observations préliminaires avaient montré que l'enzyme de levure ne requiert pas le DPN (même à un stade de semi-purification auquel l'enzyme de foie est déjà fortement stimulée par le DPN) et n'est pas inhibée par le DPNH. Il est d'autre part connu que certaines déshydrogénases, soit spontanément, soit en présence de DPNH, montrent une fluorescence dont la longueur d'onde (activation et émission) est voisine de celle du DPNH libre (*cf.* BOYER et THEORELL, 1956 ; RACKER et KRIMSKY, 1958 ; DUYSSENS et KRONENBERG, 1957 ; WINER et coll., 1959). Il a donc semblé intéressant de rechercher si l'enzyme extraite de la levure possédait une fluorescence.

Dans ce but, des cultures de *S. fragilis* ont été effectuées parallèlement sur milieu 3S contenant soit du glucose, soit du galactose, comme source carbonée. Comme il sera montré dans la troisième partie de l'exposé, l'UDPGal-4-épipimérase est formée adaptativement en présence de galactose et est absente des cultures effectuées en présence de glucose.

Il a été surprenant de constater qu'une différence très notable existe déjà entre la fluorescence des deux extraits bruts. Dès le premier fractionnement par le sulfate d'ammonium, la fraction contenant l'activité épimérasique (provenant de la culture sur galactose) garde une fluorescence importante, tandis que la fraction correspondante, provenant de la culture sur glucose, ne présente plus qu'une fluorescence très faible (voir figure 14, pic à 450 m μ).

Après purification sur colonne de cellulose, on constate qu'à l'endroit où apparaît le pic qui contient l'activité épimérasique (pic N° 8, figure 17) les fractions « glucose » continuent d'être dépourvues de fluorescence. Il existe, au contraire, dans les fractions « galactose », une corrélation étroite entre activité et fluorescence ⁽¹⁾ (voir plus loin). De plus, comme le montre le tableau 6, lorsque dans certaines conditions la conservation prolongée de l'enzyme conduit à une diminution de la fluorescence, on constate une perte parallèle de l'activité.

Le spectre de fluorescence de l'UDPGal-4-épipimérase purifiée à partir de la levure rappelle celui du DPNH, tant en ce qui concerne la longueur d'onde maximum de la fluorescence (450 m μ) que la longueur d'onde produisant le maximum d'excitation (350 m μ). Cependant, le DPNH étant inhibiteur de la réaction, nous avons formulé l'hypothèse que le corps responsable de la fluorescence de l'enzyme pouvait être le DPN (non fluorescent à l'état libre), lié à l'enzyme de telle sorte que le complexe DPN-enzyme acquiert la fluorescence caractéristique du DPNH.

TABLEAU 6

Effet du vieillissement sur la fluorescence et l'activité de l'UDPGal-4-épipimérase de S. fragilis

Les échantillons ont été conservés congelés pendant 5 semaines, dégelés et recongelés à plusieurs reprises.

N° des fractions	Fluorescence % de l'original	Activité % de l'original
32	20	20
33	30	32
35	33	29

(5) *Effet du PCMB.* VELICK (1953), et RACKER et KRIMSKY (1952) ont montré que le DPN lié à la triosephosphate déshydrogénase du muscle peut en être dissocié par action du *p*-chloromercuribenzoate, avec perte simultanée de la bande d'absorption caractéristique du complexe original DPN-enzyme.

L'action du PCMB (10⁻⁴M) sur l'épipimérase de levure a pour effet immédiat la

(1) L'UDPGal-4-épipimérase n'est pas la seule protéine fluorescente présente dans les extraits. D'autres fractions dont l'identité enzymatique n'a pas été recherchée (mais qui ne présentent pas d'activité épimérasique) apparaissent au début de l'élution.

diminution et, après environ 4 minutes, la disparition complète de la fluorescence de l'enzyme. La figure 15 en donne un exemple.

6) *Réactivation de l'enzyme après traitement par le PCMB. Propriétés de la nouvelle enzyme.* — L'enzyme traitée est reprécipitée par le sulfate d'ammonium et redissoute dans l'eau. Comme le montre le tableau 7, seule une activité très faible peut être décelée en absence de DPN. Cependant, de même que l'enzyme de foie, l'enzyme de levure, après traitement par le PCMB (« enzyme traitée ») présente une exigence absolue envers ce coenzyme. D'autre part, l'« enzyme traitée » ne présente plus aucune fluorescence (seule, en combinaison avec le DPN ou avec substrat + DPN) ce qui l'apparente également à l'enzyme de foie, laquelle n'est jamais fluorescente.

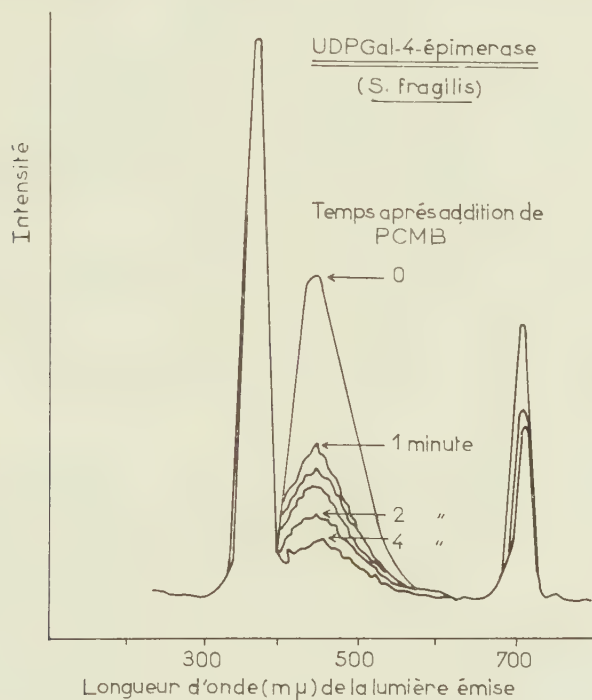


FIG. 15. — UDPGal-4-épipimérase de *Saccharomyces fragilis* : évolution du spectre de fluorescence au cours du traitement par le PCMB ($10^{-4}M$).

D'autres propriétés la rapprochent de cette enzyme : comme le montre le tableau 7, la réactivation de l'« enzyme-traitée » a lieu de façon spécifique par le DPN (DPNH, TPN, TPNH sont inactifs). Le DPNH, en présence de DPN est légèrement inhibiteur. Le K_m pour le DPN (lorsque substrat et enzyme sont en excès) est de l'ordre de $10^{-5}M$ dans le cas de l'enzyme de levure traitée puis réactivée, alors qu'il est de l'ordre de $10^{-7}M$ pour l'enzyme de foie. La cystéine, en présence de DPN, stimule (environ 30 p. 100) l'activité de l'« enzyme-traitée », mais seule, reste inactive. Or, la cystéine est sans effet sur l'enzyme de levure non traitée, alors qu'elle stimule l'activité de l'enzyme de foie. Il semble donc qu'un état réduit de l'enzyme favorise son activité en présence de DPN exogène.

Il est également intéressant de remarquer que la réactivation par le DPN et la cystéine ne permet de retrouver que 20 p. 100 environ de l'activité originale de l'enzyme non traitée (voir tableau 7). Ceci peut être rapproché du fait, déjà signalé (voir préparation de l'enzyme), que l'enzyme de levure non-traitée présente, au même stade de purification, une activité cinq fois supérieure à celle de l'enzyme de foie. Il est possible que le complexe temporaire du type DPN-épipimérase de foie, peut-être identique au complexe DPN-PCMB épimérase de levure », soit cinq fois moins efficace que le complexe stable, fluorescent, DPN-épipimérase de levure non-traitée.

TABLEAU 7

Réactivation de l'UDPGal-4-épipimérase de *S. fragilis* ; spécificité du DPN

2 ml de l'une des fractions les plus actives après chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose ont été traités pendant 30 minutes par addition de 20 μ l de PCMB 10^{-3} M. L'enzyme a été ensuite reprécipitée par addition de 5 mg d'albumine et 0,8 mg de $\text{SO}_7(\text{NH}_4)_2$ et redissoute dans 2 ml d'eau. Le mélange d'incubation contenait : 0,05 μ mole d'UDPGal, 20 μ moles de cystéine, 20 μ l d'enzyme traitée et des nucléotides selon les indications portées dans le tableau. Le volume total était 0,5 ml et rendu 0,1 M en tampon glycérolle pH 8,8. L'incubation, à température ordinaire, 30 minutes, était arrêtée par addition de 1 ml de chloroforme. Le dosage de la quantité d'UDPG formé était effectué spectrophotométriquement par addition de DPN et d'UDPG déshydrogénase.

Nucléotide ajouté	UDPG formé (μ moles)
Enzyme non-traitée	76
Enzyme traitée ; sans addition	< 0,5
DPN 6×10^{-5} M	16
DPN 6×10^{-6} M	3,0
DPN 6×10^{-7} M	1,0
DPNH 1×10^{-4} M	0,5
TPN 2×10^{-4} M	0,5
TPNH 2×10^{-4} M	< 0,5
DPN 6×10^{-5} M + DPNH 1×10^{-5} M ...	13

7) *Effet des DPNases.* — Deux enzymes d'origines différentes attaquant spécifiquement le DPN ont été essayées : l'une est extraite d'un *Clostridium*, l'autre est la DPNase classique de *Neurospora*. Après incubation avec chacune de ces deux enzymes, puis fractionnement, l'activité de l'épipimérase de levure est complètement abolie.

Tous les résultats et les comparaisons qui précèdent sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle le DPN serait le composé lié à l'enzyme de levure, composé responsable de sa fluorescence, et indispensable à son activité. Il était cependant nécessaire d'en apporter des preuves directes. Ceci a été réalisé par trois méthodes différentes.

8) *Identification du DPN lié à l'enzyme de levure.* — Les dosages ont été effectués, soit individuellement, sur les fractions provenant de la colonne de cellulose, soit sur un mélange de plusieurs fractions. Dans ce dernier cas, le mélange était concentré par lyophilisation puis ajusté à pH 3 par addition de HCl, 1 M. Pour chaque détermination deux échantillons semblables étaient prélevés. L'un d'eux était incubé pendant deux heures à 37° avec un excès de DPNase de *Neurospora* et était ensuite utilisé comme contrôle.

a) *Détermination chimique.* — La méthode de CIOTTI et KAPLAN (1957) utilisant la méthyl-éthyl-cétone a été employée. Cette méthode, appliquée à chaque fraction provenant de la colonne de cellulose a donné les résultats représentés dans

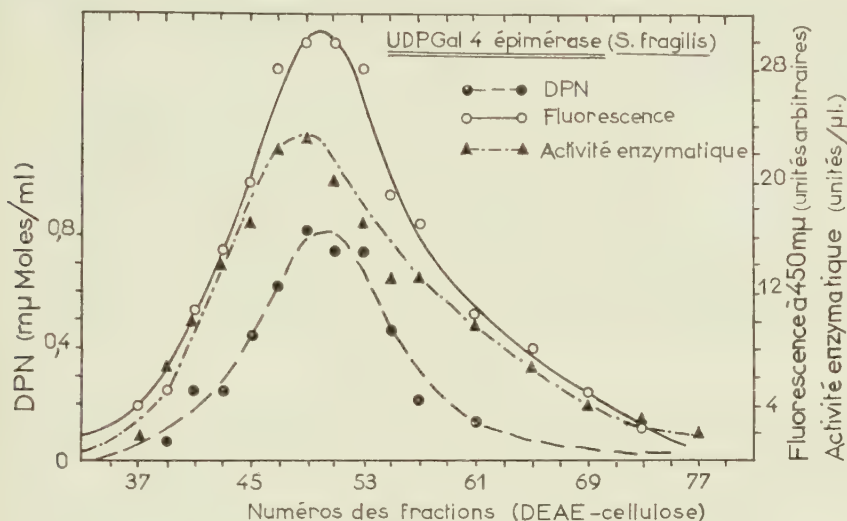


FIG. 16. — Chromatographie de l'UDPGal-4-épipimérase de *Saccharomyces fragilis* sur colonne de DEAE-cellulose. Activité enzymatique, fluorescence et contenu en DPN des fractions isolées.

la figure 16. On voit qu'une excellente corrélation est ainsi mise en évidence entre l'activité, la fluorescence et la quantité de DPN qui peut être extraite de l'enzyme et dosée spécifiquement par cette méthode. La fraction la plus active contenait $0,3 \mu$ mole de DPN pour 100 mg d'enzyme.

b) *Détermination enzymatique.* — Ces déterminations ont été effectuées sur des échantillons moyens composés de plusieurs tubes prélevés, soit au centre du pic de l'épipimérase, soit de part et d'autre de ce pic. Après lyophilisation et ajustement du pH, 10 mg de Darko KB ont été ajoutés ; chaque mélange, agité mécaniquement pendant 45 minutes, a été centrifugé et lavé une fois par HCl 0,01 N. Les nucléotides adsorbés ont été élués par 5 ml d'éthanol à 50 p. 100 contenant 1 ml de NH_4OH concentré par litre. L'éluat a ensuite été concentré par évaporation et l'alcool ainsi éliminé du résidu.

Dosage par couplage avec le système enzymatique pyruvate-lacodéshydrogénase + alcool-déshydrogénase et dosage du pyruvate en excès, selon une modification de la méthode utilisée par BURMA et HORECKER (1958) : les résultats de ce dosage sont résumés dans le tableau 8. Alors que le dosage par la méthyl-éthyl-cétone donne $0,012 \mu$ mole de DPN dans l'échantillon moyen considéré ici (tubes 46-53), les données du tableau 8 ne donnent qu'une valeur minimum de $0,006 \mu$ mole, soit 50 p. 100 de la valeur précédente.

Dosage par activation de l'UDPGal-4-épipimérase de foie : On sait que la vitesse de la réaction est proportionnelle (dans une certaine zone) à la concentration en DPN (MAXWELL, 1957). Les stimulations observées pour les échantillons 2 et 3, traités

TABLEAU 8

Identification du DPN par dosage du pyruvate disparu

Le mélange d'incubation contenait : 20 μ l d'éthanol à 95 p. 100, 0,25 μ mole de pyruvate de sodium, un large excès de lactico- et d'alcool-déshydrogénase, et, soit une quantité connue de DPN, soit une partie aliquote de la solution à analyser. Le volume final de 0,2 ml était rendu 0,01 M en tampon phosphate pH 7,4, incubé pendant 20 minutes, à température ordinaire, puis inactivé par ébullition pendant 3 minutes. Le pyruvate restant après incubation était déterminé spectrophotométriquement par addition de DPNH et de lactico-déshydrogénase.

Additions	Pyruvate réduit (μ moles)
Sans addition	5
DPN 0,18 μ moles	22
DPN 0,35 μ moles	44
DPN 0,70 μ moles	72
Eluat Darko, (46-53) 25 μ l	92
Eluat Darko, (46-53) 50 μ l	160

comme ci-dessus, correspondant aux tubes centraux du pic de l'épimérase, conduisent à une valeur approximative de 0,2 μ mole de DPN pour 100 mg de protéine. Les échantillons 1 et 4, également traités, provenant de fractions n'ayant pas d'activité épimérasique, ne produisent aucune stimulation (voir tableau 9).

Ces trois valeurs, obtenues par des méthodes très différentes, et bien que la seconde soit un peu faible, sont en bon accord et montrent de façon certaine que le composé lié à l'enzyme est bien du DPN.

TABLEAU 9

Identification du DPN par mesure de l'activation de l'UDPGal-4-épimérase de foie

Le mélange d'incubation contenait : 0,06 μ mole d'UDPGalactose, 10 μ g d'UDPGal-4-épimérase purifiée à partir de foie de veau et, soit une quantité connue de DPN, soit une partie aliquote de la solution à analyser, dans un volume final de 0,5 ml et tampon glycolle 0,1 M, pH 8,8. L'incubation, à température ordinaire, 10 minutes, était arrêtée par ébullition 1 minute. La quantité d'UDPG formée pendant l'incubation était déterminée spectrophotométriquement par addition de DPN et d'UDPG déshydrogénase.

Additions	UDPG formé (μ moles)
Sans addition	0,5
DPN 0,075 μ moles	3,1
DPN 0,15 μ moles	5,7
DPN 0,37 μ moles	9,0
DPN 0,75 μ moles	11,0
Eluat Darko n° 1 (en dehors du pic)	0,5
Eluat Darko n° 2 (à l'intérieur du pic)	6,2
Eluat Darko n° 3 (à l'intérieur du pic)	6,4
Eluat Darko n° 4 (en dehors du pic)	0,5

9) *Pureté de l'enzyme.* — L'enzyme purifiée ne contient pas d'autres enzymes du métabolisme du galactose, et aucune des enzymes utilisées dans les tests enzymatiques utilisés couramment au cours de ce travail (UDPG-déshydrogénase, G-1-P/PP uridytransférase, phosphoglucomutase, glucose-6-phosphate déshydrogénase).

Si l'on compare les diagrammes obtenus dans deux préparations parallèles, l'une effectuée à partir de cellules cultivées sur glucose, et l'autre à partir de levures cultivées sur galactose, on constate, grâce à la grande reproductibilité des diagrammes d'éluion, que le pic contenant l'épimérase (pic N° 8) est représenté par un pic protéique correspondant, dans la préparation où l'enzyme n'est pas présente (voir figure 17).

La figure 18 reproduit la variation de l'activité spécifique en fonction de l'éluat. Cette figure contient, en surimpression, le pic protéique, tel qu'il peut être redessiné à partir du diagramme d'éluion. On voit que ce pic s'identifie avec le « cœur » de l'activité, les queues » » et les « têtes » correspondant visiblement à des phénomènes d'entraînement par les pics protéiques adjacents.

L'examen du contenu en DPN des fractions les plus pures de l'enzyme (voir précédemment) conduit au chiffre approximatif de 0,3 μ mole de DPN pour 100 mg de protéines. Quel que soit le rôle que l'on attribue au DPN il doit y avoir au moins 1 mole de DPN par mole d'enzyme. On peut donc faire le calcul représenté dans le tableau 10.

TABLEAU 10

Relation entre le contenu en DPN et le poids moléculaire de l'enzyme

Pureté de l'enzyme	Moles DPN/Mole Enzyme		
	1 Mole	2 Moles	4 Moles
Poids moléculaire			
100 %	500 000	1 000 000	2 000 000
50 %	250 000	500 000	1 000 000
25 %	125 000	250 000	500 000
12 %	62 500	125 000	250 000
6 %	31 250	62 500	125 000

Si l'on postule un poids moléculaire de 125 000, la pureté de la préparation se situerait entre 6 et 25 p. 100 selon que l'on admet 1, 2 ou 4 moles de DPN par mole d'enzyme.

10) *Expériences utilisant le tritium.* — Plusieurs tentatives, effectuées dans des conditions semblables à celles déjà signalées (KALCKAR et MAXWELL, 1956; KOWALSKI et KOSHLAND, 1956; MAXWELL, 1957), ont été faites à l'aide de différentes préparations de l'UDPGal-4-épimérase de levure. Comme dans le cas de l'enzyme de foie, ou de celui de *L. bulgaricus*, les résultats ont été entièrement négatifs, aussi bien en effectuant la réaction dans de l'eau tritiée qu'en présence de DPN tritié et de DPNH contenant deux atomes de tritium en position *para*. Par exemple, dans une expérience utilisant 0,1 ml d'eau tritiée et une radioactivité de 2×10^{10} cpm, 140 cpm ont été retrouvés dans les 0,5 μ moles de nucléotides introduites, alors que le contrôle (mélange réactionnel porté à 100° au temps 0 de l'expérience) contenait 120 cpm. De même, à partir de 0,54 μ mole de DPNH contenant 9500 cpm, les 4 échantillons (2 contrôles, 2 incubations) renfermaient, en fin d'expérience, entre 10 et 20 cpm.

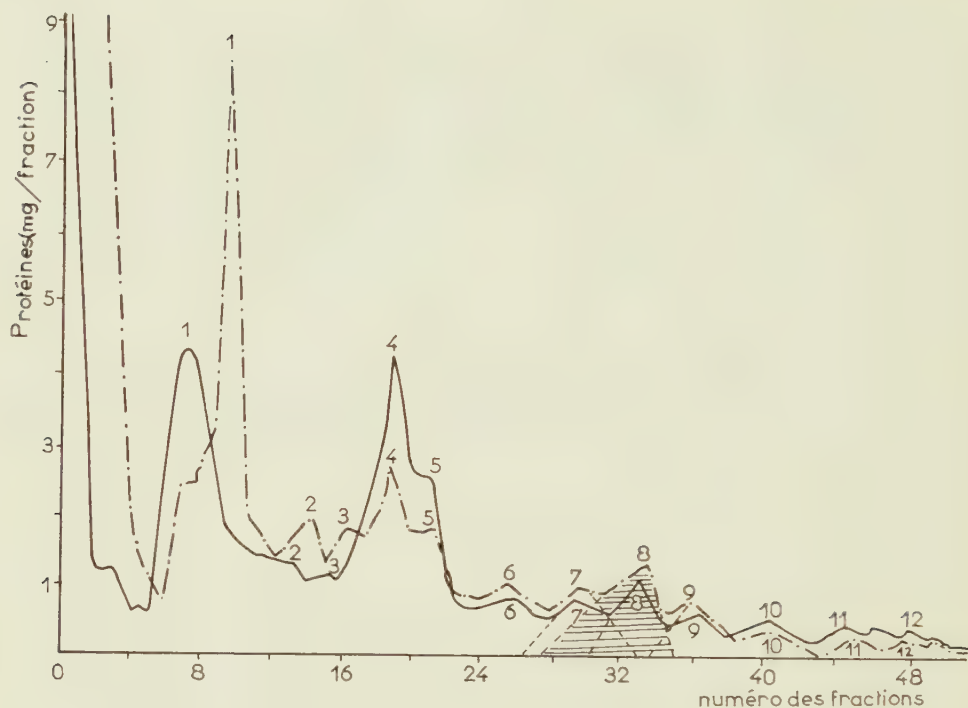


FIG. 17. — Chromatographie d'extraits semi-purifiés de *Saccharomyces fragilis*, adaptée et non-adaptée, sur colonne de DEAE-cellulose.

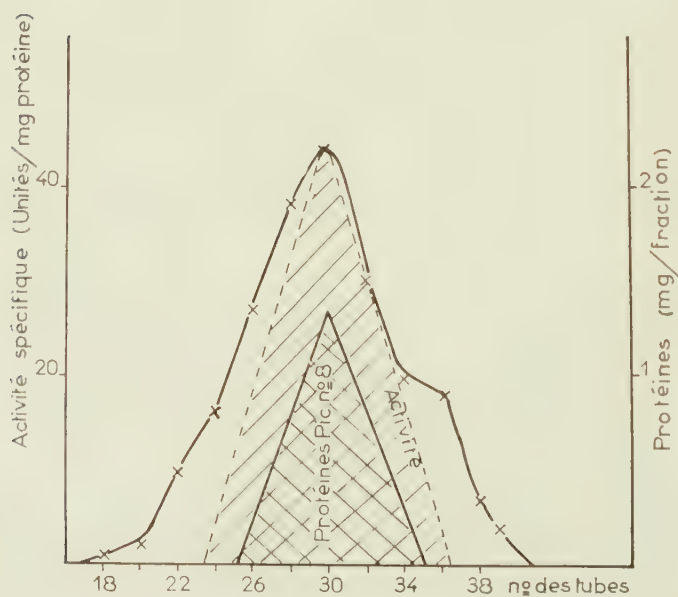


FIG. 18. — Coïncidence du pic protéique N° 8 et du pic contenant l'UDPGal-4-épimérase.

L'interprétation à donner à ces résultats ne pourra être discutée qu'après avoir été soumise à l'examen critique des résultats obtenus grâce à l'utilisation du tritium ou du deuterium dans les réactions classiques d'oxydo-réduction.

4.5. DISCUSSION.

La plupart des faits décrits au cours de ce chapitre ont été discutés au fur et à mesure de leur présentation. La présente discussion sera donc limitée au problème posé par le mécanisme de la réaction d'épimérisation, réaction catalysée par l'UDPGal-4-épimérase.

Les expériences qui viennent d'être décrites ont permis de montrer que la différence majeure existant entre l'enzyme extraite de foie et l'enzyme extraite de la levure — non exigence pour le DPN de l'une, exigence absolue pour le DPN de l'autre — s'explique par le fait que l'enzyme de levure contient du DPN lié à l'apo-enzyme. Le DPN étant éliminé par divers traitements, l'enzyme traitée qui en résulte se comporte à tous points de vue comme l'enzyme de foie.

Ces faits sont à rapprocher de l'observation de KOWALSKY et KOSHLAND concernant l'enzyme de *Lactobacillus bulgaricus*. En effet, cette enzyme ne requiert pas le DPN. Toutefois, son activité est détruite par incubation avec une DPNase.

Ces propriétés de l'enzyme, obtenue à partir de trois organismes différents, permettent donc de conclure que le DPN est indispensable à l'activité de l'UDPGal-4-épimérase.

Ceci est confirmé par plusieurs faits : — 1) le DPNH exerce une inhibition, de caractère compétitif, de la stimulation produite par le DPN sur l'activité de l'enzyme de foie ; — 2) le DPNH inhibe également l'activité de l'enzyme-traitée de levure, en présence de DPN ; — 3) les effets du DPN (stimulateur) ou du DPNH (inhibiteur) sont rigoureusement spécifiques. Ni le TPN, ni le TPNH, ni aucun de leurs analogues structuraux ne peuvent les remplacer.

Tous ces faits sont en accord avec un mécanisme d'oxydo-réduction sans toutefois le démontrer. C'est pourquoi plusieurs auteurs ont entrepris de rechercher si du tritium ou de l' ^{18}O se trouvaient incorporés dans les nucléotides uridyliques, au cours de la réaction d'épimérisation. Ces expériences ont été effectuées de trois manières : — 1) en employant de l'eau tritiée (KALCKAR et MAXWELL, 1956 ; MAXWELL, 1957 ; MAXWELL et de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1960) ; — 2) de l'eau contenant de l' ^{18}O (ANDERSON, LANDEL et DIEDRICH, 1956 ; KOWALSKI et KOSHLAND, 1956) ; — 3) du DPN ou du DPNH tritiés (MAXWELL, 1957 ; MAXWELL et de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1960.)

Toutes ces expériences utilisant l'enzyme provenant de ces trois organismes (mammifères, *L. bulgaricus*, levure) ont amené à des conclusions identiques : il n'y a, en aucun cas, aucune incorporation décelable de tritium ou d' ^{18}O à partir de l'eau, du DPN ou du DPNH.

Comme cela a été discuté par tous les auteurs précédemment cités, tous les mécanismes proposés — à l'exception de l'oxydo-réduction — auraient dû conduire à l'incorporation dans les nucléotides uridyliques de l'un ou de l'autre des isotopes employés. En effet, les mécanismes de — déshydratation-réhydratation, — scission produisant un aldol suivie de rotation et recondensation, — inversion de WALDEN prise dans le sens d'un déplacement par les éléments de l'eau (H^+ ou OH^-) voir

figure 19), — passage par l'intermédiaire d'un inositol, impliquent l'échange (c'est-à-dire l'incorporation), soit d'une molécule d'eau, soit de l'un au moins de ses éléments.

L'absence d'incorporation observée dans les expériences précédemment mentionnées permet donc, sans apporter de preuve formelle d'un mécanisme d'oxydo-réduction, d'éliminer les quatre autres mécanismes envisagés.

Il est cependant nécessaire de ne pas perdre de vue que cette liste de mécanismes n'est pas exhaustive. On pourrait imaginer d'autres mécanismes dans lesquels le DPN aurait un rôle différent de celui qu'il joue dans l'oxydo-réduction, par exemple celui d'assurer la configuration de l'apo-enzyme favorable à la bonne marche de la réaction. Néanmoins, puisqu'il n'existe aucune information en faveur d'un autre mécanisme, le mécanisme d'oxydo-réduction semble, actuellement, le plus probable. Avant d'envisager d'autres hypothèses, il semble donc plus rationnel de chercher tout d'abord à soumettre l'hypothèse de l'oxydo-réduction à une critique qui permettrait de la confirmer ou de l'infirmer.

La suite de cette discussion sera, par conséquent, fondée sur l'interprétation

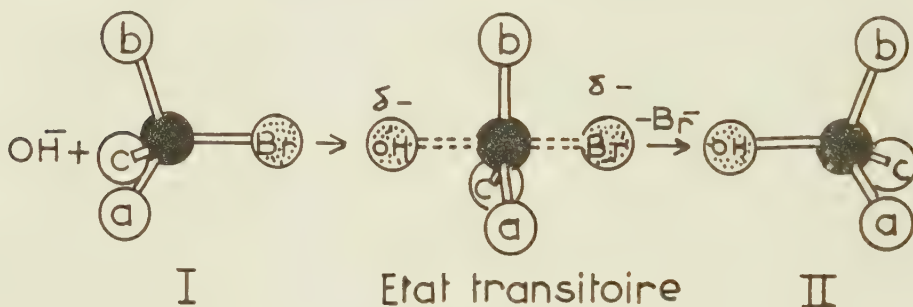


FIG. 19. — *Inversion de Walden.*
Selon FIESER et FIESER, 1950.

des expériences isotopiques, en fonction d'un mécanisme d'oxydo-réduction. Pour cela, il sera nécessaire d'exposer au préalable les résultats obtenus par l'utilisation des isotopes dans l'étude du mécanisme classique de l'oxydo-réduction, tel qu'il est catalysé par les déshydrogénases à DPN ou TPN. Les déductions qui en ont été tirées pourront être ensuite appliquées au cas de l'épimérisation.

Le mécanisme général des réactions catalysées par des déshydrogénases, étudié par PULLMAN et coll. (1954) et LOEWUS et coll. (1955), implique que deux atomes d'hydrogène sont enlevés au substrat. Le schéma le plus communément admis (voir figure 20) suggère la formation d'un composé d'addition intermédiaire entre le DPN et les deux atomes d'hydrogène, l'un en *para*, l'autre sur l'azote quaternaire. Le remaniement des doubles liaisons conduirait alors à l'expulsion du deuxième proton, l'électron se trouvant retenu sur l'atome d'azote, qui perd ainsi sa charge positive. Au cours de la réaction inverse, deux atomes d'hydrogène doivent être transférés au substrat (2 protons + 2 électrons), l'un provient du DPNH, tandis que l'autre provient du milieu. Le retour du noyau pyridinique à la forme oxydée conduit à l'apparition d'un azote tétravalent, lequel perd automatiquement un électron et acquiert le charge positive caractéristique du DPN.

Théoriquement, pour les composés pouvant exister sous formes d'isomères optiques, il devrait y avoir formation de tels isomères au cours de réactions de ce type. Cependant, les réactions de déshydrogénation classique (lactico-déshydrogénase, par exemple) ne s'accompagnent jamais d'inversion. Pour expliquer cette absence il a été nécessaire d'introduire le concept de l'« attachement en trois points » (OGSTON, 1948), selon lequel le substrat se trouve fixé sur l'enzyme de telle sorte

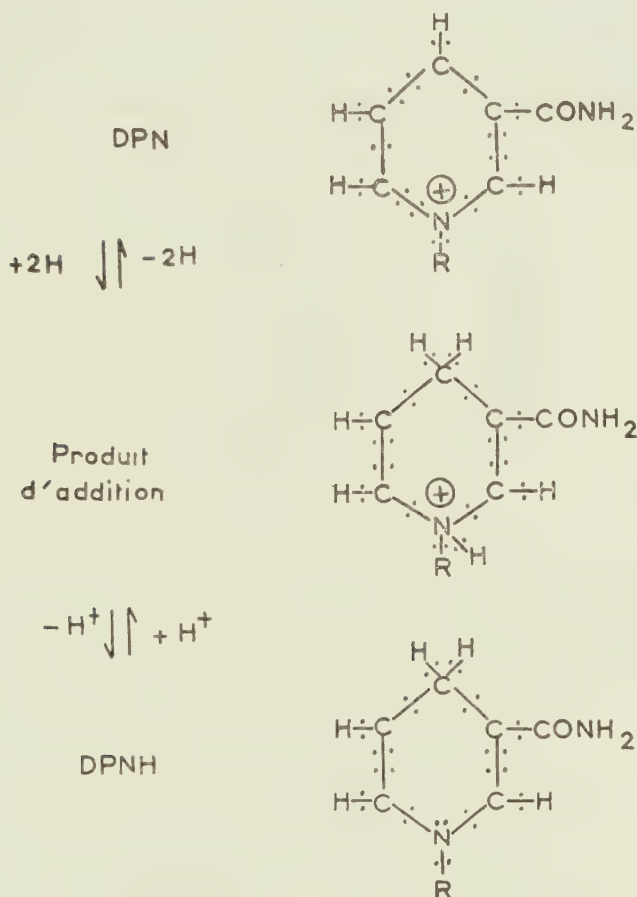


FIG. 20. — Réduction du DPN en DPNH.

que seul l'un des isomères optiques puisse réagir ou se former. On voit donc que la spécificité enzymatique peut modifier considérablement les prévisions théoriques.

Dans le cas des déshydrogénases, la stéréospécificité s'exerce non seulement vis-à-vis du substrat, mais aussi vis-à-vis du DPN. On sait, en effet, depuis les travaux de WESTHEIMER (1954) et de VENNESLAND (1958), que les déshydrogénases peuvent être classées en deux groupes selon qu'elles s'attaquent à l'hydrogène α ou à l'hydrogène β de la position *para* du DPNH, c'est-à-dire selon que l'enzyme oriente

le noyau pyridinium de telle sorte que seule l'une (ou l'autre) de ses faces soit disponible (voir figure 21).

C'est ainsi que, dans la réaction catalysée par l'alcool déshydrogénase, si l'on utilise du DPNH deutéré, le deuterium transféré sur l'acétaldéhyde provient spécifiquement de l'une des deux positions, à l'exclusion de l'autre (WESTHEIMER et coll., 1951). D'autre part, des deux types d'alcool mono-deutééré, CH_3CHDOH et CH_3CDHOH , un seul est capable de transférer son deuterium au DPN (LOEWUS et coll., 1953).

Dans les expériences utilisant le tritium ou le deutérium, seuls les atomes d'hydrogène fixés au carbone sont stables, tandis que ceux fixés à l'azote ou à l'oxygène sont très rapidement échangés avec le milieu. Les transferts de protons sont donc décelables seulement lorsqu'ils sont, au départ ou à l'arrivée, fixés à un atome de carbone.

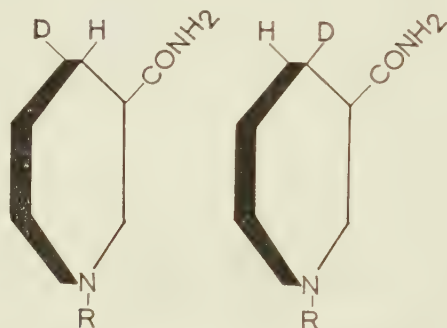
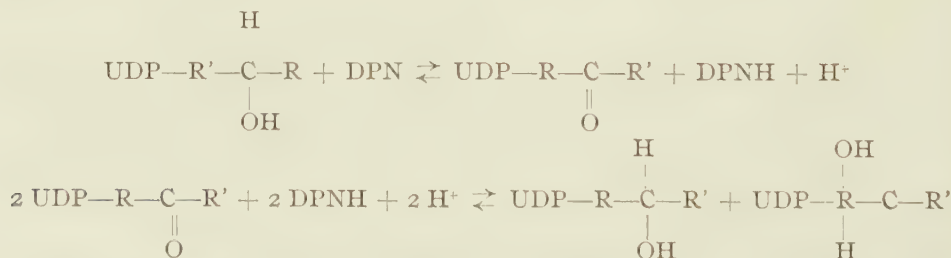


FIG. 21. — Les deux stéréoisomères de DPND.
Selon VENNESLAND, 1958.

En se basant sur le mécanisme général des réactions d'oxydo-réduction dont il vient d'être question, la réaction catalysée par l'UDPGal-4-épipérase pourrait s'écrire de la manière suivante :



L'absence d'incorporation de tritium au cours de cette réaction d'épimérisation montre que l'enzyme doit posséder vis-à-vis du DPN une stéréo-spécificité du type de celle des déshydrogénases précédemment mentionnées, c'est-à-dire que le proton, provenant du substrat et se fixant sur le DPN, est spécifiquement réintégré sur le composé intermédiaire ⁽¹⁾. Ici, toutefois, contrairement au cas des déshydrogénases

⁽¹⁾ Le fait que le DPNH soit dans les deux cas un inhibiteur de la réaction prouve qu'il a accès à l'enzyme. S'il se formait du DPNH libre, transitoirement, au cours de la réaction, on devrait s'attendre à trouver, en présence de DPNH tritié, une incorporation de tritium dans les deux hexoses. Puisque tel n'est pas le cas (MAXWELL, 1957 ; MAXWELL et de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1960) on doit admettre que le DPN (ou le DPNH compétiteur) sont associés à l'enzyme pendant la réaction, même dans le cas de l'épipérase de foie.

classiques, le retour de ce proton doit pouvoir se faire indifféremment d'un côté ou de l'autre de la fonction cétone (intermédiaire hypothétique) conduisant à la formation des deux hexoses épimères.

KALCKAR (1958) avait avancé l'hypothèse tendant à attribuer au noyau de l'uracile un rôle au moins partiel au cours de la réaction d'épimérisation.

Afin d'obtenir certaines indications concernant le mécanisme capable de conduire à une telle épimérisation, il était intéressant de se faire une idée de la configuration de la molécule d'un nucléotide uridylique. La construction d'un modèle moléculaire de l'UDPG m'a permis de constater que cette molécule peut exister, sans empêchement stérique, sous une forme repliée du type de celle proposée par SZENT-GYORGYI pour l'ATP (1957). Cette structure est représentée dans la figure 22a et 22b. Les atomes importants ont été hachurés de façon différente. Afin de permettre de suivre plus facilement les migrations de chacun des deux atomes d'hydrogène provenant du carbone-(4) de l'hexose, l'hydrogène de la fonction OH a été remplacé dans le modèle par un atome de Fluor.

La forme particulière de la molécule, telle qu'elle est représentée dans la figure 22 montre que le noyau de l'uracile est situé directement au-dessus de celui de l'hexose. De plus, il est très intéressant de remarquer que le groupement -CO-NH-CO- de l'uracile se trouve situé de part et d'autre de la position 4 de l'hexose.

Comme cela a été précédemment indiqué, la transformation du DPN en DPNH nécessite l'addition d'un atome d'hydrogène (1 proton + 1 électron), et d'un électron. On pourrait considérer le second atome d'hydrogène enlevé au substrat comme un donateur spécifique d'électron pour le DPNH (voir figure 20). Il serait alors possible de concevoir d'autres mécanismes dans lesquels l'électron supplémentaire serait fourni par un donateur d'électron autre que l'hydrogène.

La configuration de l'UDPG, jointe aux obligations de stéréospécificité, permet de concevoir un schéma d'oxydo-réduction à double catalyse, dans lequel les deux catalyseurs, DPN et uracile, sont capables d'accepter conjointement, chacun un atome d'hydrogène provenant du substrat. Il est implicitement admis que, de même que dans le mécanisme classique, l'H transféré du DPN sera toujours celui qui est lié au carbone (4) dans la molécule de l'hexose, tandis que l'H transféré à l'uracile proviendra toujours de l'hydroxyle de ce même carbone (4).

Le schéma proposé est représenté dans la figure 23. On peut rendre compte des phases successives de la réaction de la manière suivante :

1) 2 atomes d'hydrogène sont enlevés simultanément au 4^{ème} carbone de l'hexose qui devient un 4-céto-hexose, intermédiaire hypothétique (voir aussi figure 22c).

2) 1 atome d'hydrogène est fixé sur le DPN en position *para*.

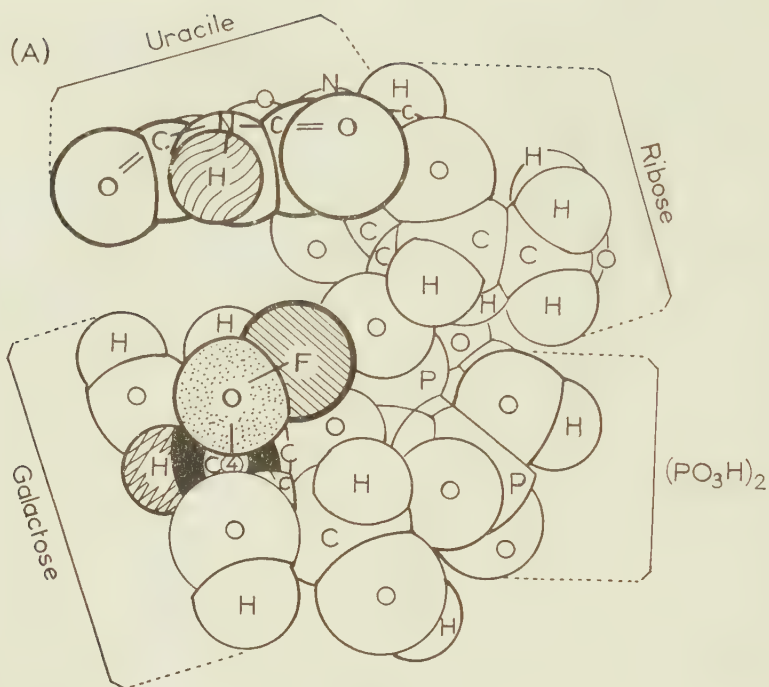
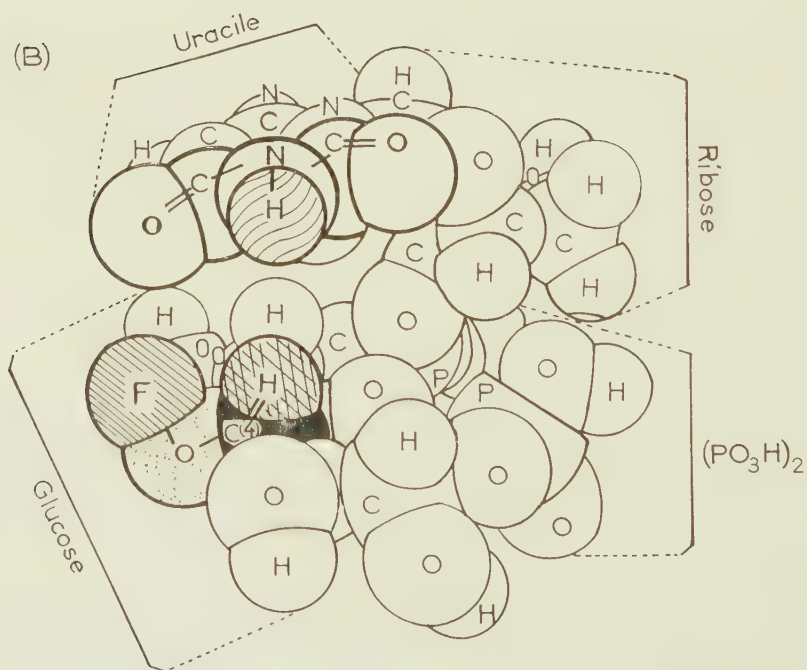
1 atome d'hydrogène est fixé sur l'une des positions cétone de l'uracile (selon que l'hexose de départ est le glucose (figure 22b) ou le galactose (figure 22a) l'une des deux positions sera plus proche que l'autre du groupement $\text{—C}^{=}\text{OH}$ de l'hexose (figure 22c ou 22d) respectivement.

3) Simultanément, les 2 noyaux sont amenés au remaniement des doubles liaisons. En conséquence :

a) sur le noyau de l'uracile, l'H, lié à l'azote migre sur la position cétone restée libre (figure 22c et 22d). De ce fait, l'azote (3) devient —N^- , et perd un électron ;

b) sur le noyau du DPN, le N^+ perd sa charge, en acquérant un électron.

4) Le groupement —CO—NH—CO— de l'uracile au départ, étant devenu un

FIG. 22 *a*.FIG. 22 *b*.

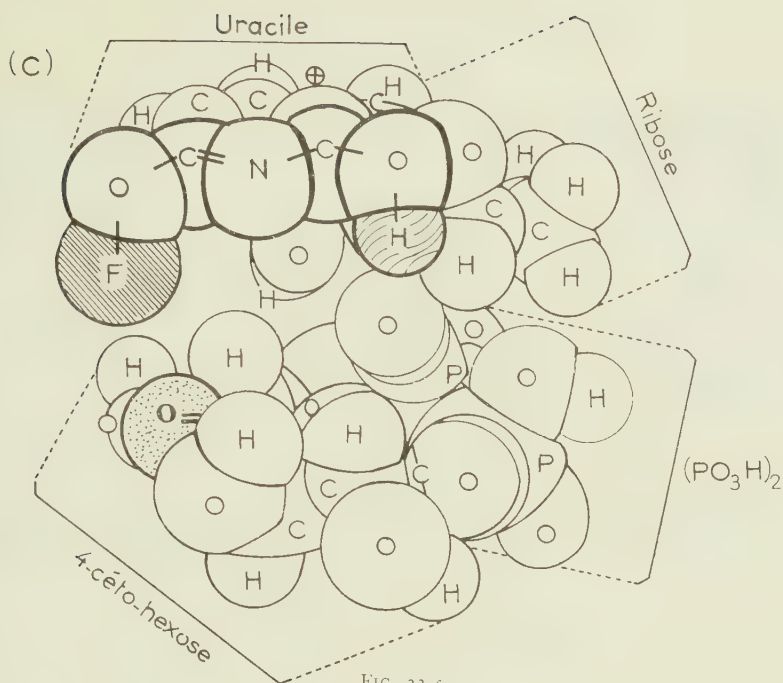


FIG. 22 c.

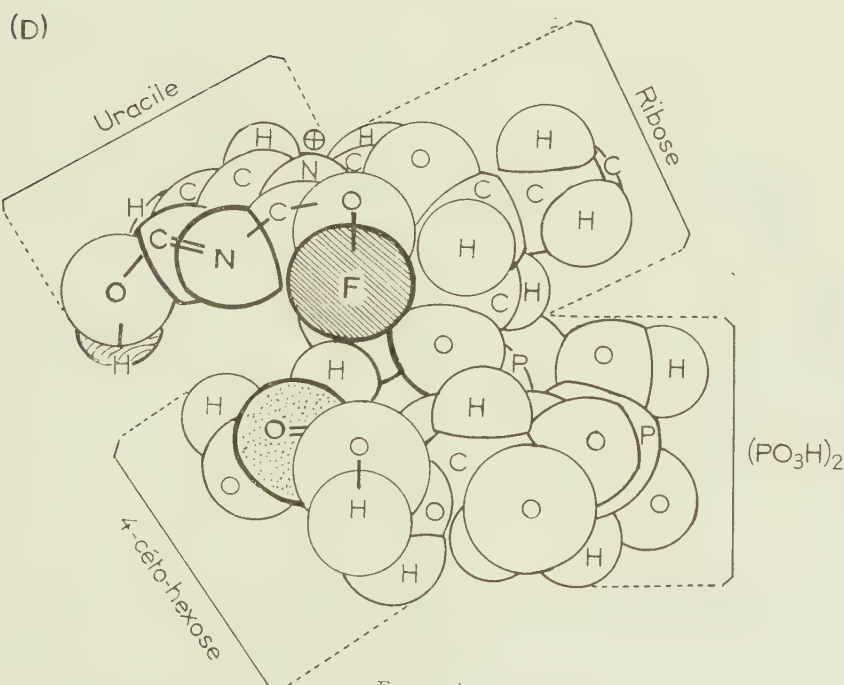


FIG. 22 d.

FIG. 22. — Modèle moléculaire de l'Uridine-diphospho-galactose (22a), de l'Uridine-diphospho-glucose (22b) et des nucléotides céto-hexose hypothétiques qui en dérivent (22c et 22d).

Les atomes importants ont été hachurés de façon différente. L'hydrogène de la fonction -OH du carbone - (4) de l'hexose a été remplacé par un atome de fluor.

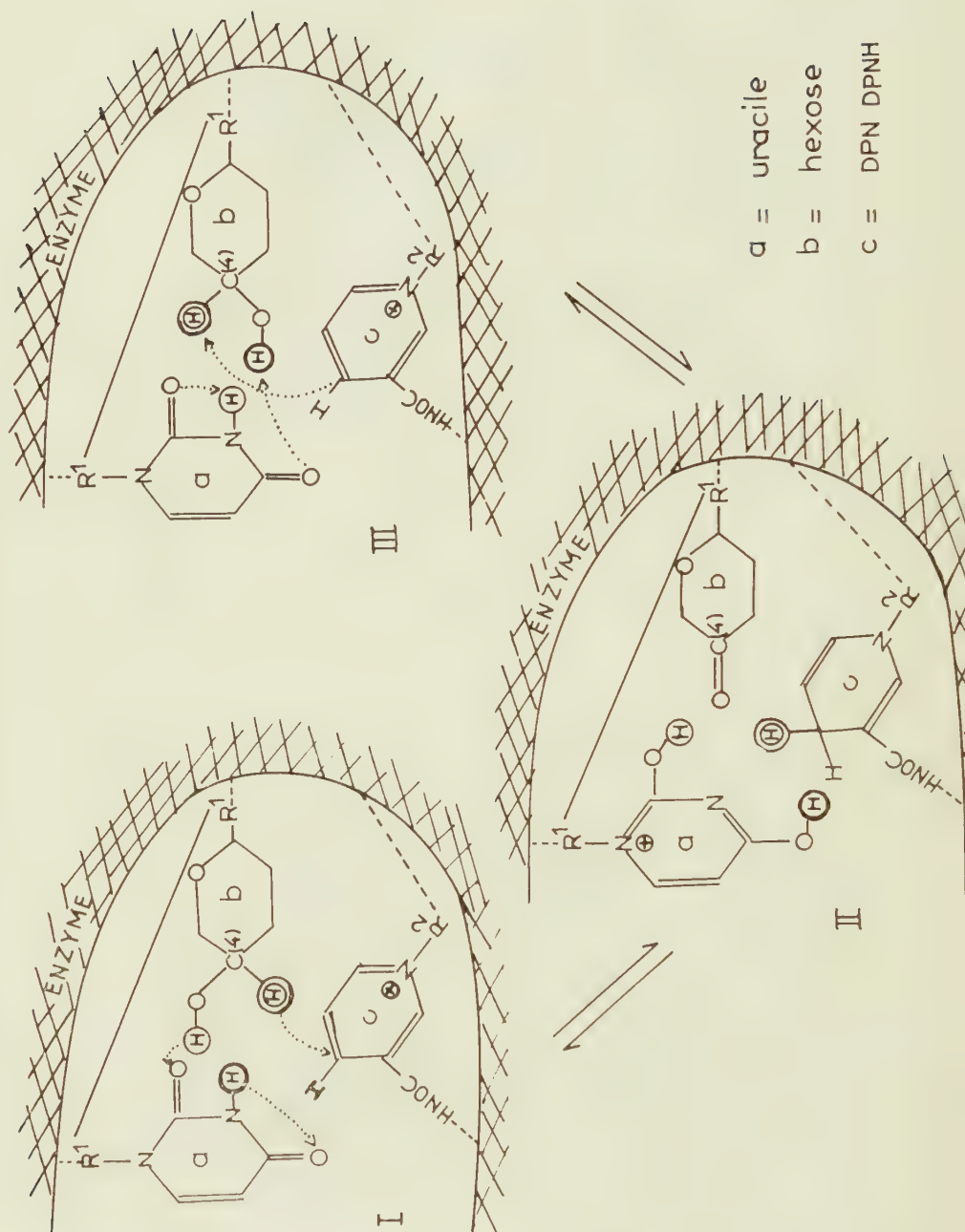
Schéma de l'épimérisation $\text{UDP Gal} \rightleftharpoons \text{UDPG}$ 

FIG. 23. — Schéma de la réaction d'épimérisation $\text{UDP Gal} \rightleftharpoons \text{UDPG}$.
Se reporter au texte.

diénol, —C=N=C— dont les deux OH sont situés à distance sensiblement égale

$$\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ | \quad | \\ \text{—C=N=C—} \end{array}$$

du groupement cétonique en position (4) de l'hexose, le retour d'un atome d'hydrogène peut avoir lieu à partir de l'un ou de l'autre de ces deux hydroxyles, provoquant, ou non, l'inversion.

5) Simultanément, les deux noyaux remanient à nouveau leurs liaisons : le DPNH retourne à la forme pyridinium⁺ et perd un électron, tandis que l'uracile retourne à la forme cétonique, ce qui ramène sur l'azote l'H du second hydroxyle, et supprime la charge du noyau par acquisition d'un électron.

Au cours de ce processus d'oxydo-réduction d'un nouveau type, les deux atomes d'hydrogène enlevés au substrat seraient donc fixés sur deux noyaux différents, l'uracile et le DPN. Ceci est rendu possible par un phénomène de compensation des charges entre les deux noyaux.

On sait que l'équilibre de la réaction est en faveur du glucose (25 p. 100 UDPGal, 75 p. 100 UDPG) (LELOIR, 1951). Ces différences pourraient refléter le fait que selon certaines données théoriques la réactivité des deux fonctions cétoniques de l'uracile n'est pas identique (PULLMAN, 1959) et, par conséquent, rendre compte de la formation préférentielle de l'un des deux hexoses épimères.

Dans ce mécanisme, l'enzyme qui, on le sait, est capable de fixer le DPN (temporairement ou de façon permanente), provoquerait également la formation d'un complexe avec le substrat et favoriserait, de plus, la forme repliée de la molécule nucléotidique, telle qu'elle est représentée dans la figure 22, mettant ainsi en contact les trois composantes du système : Hexose-Uracile-DPN.

Il a déjà été indiqué que les atomes d'hydrogène liés à l'oxygène ou à l'azote sont rapidement échangeables (VENNESLAND et WESTHEIMER, 1954). Seuls, par conséquent, les atomes d'hydrogène liés au carbone peuvent être utilement marqués par le deutérium ou le tritium.

Dans la réaction présente, l'utilisation des substrats, tritiés sélectivement en position 4 de l'hexose, permettrait de suivre d'une manière positive le transfert spécifique (sans perte), au cours de l'inversion, de l'atome d'hydrogène lié au carbone.

Ceci ne semble guère réalisable à l'heure actuelle. Reste la possibilité, employant des substrats tritiés uniformément, de déceler le passage de l'atome d'hydrogène (ou de tritium) sur le DPNH intermédiaire. Les conditions habituelles de l'essai enzymatique ne permettent pas l'accumulation de produits intermédiaires. Jusqu'à présent, toutes les tentatives tendant à provoquer l'accumulation du 4-cétohexose (intermédiaire supposé) et, par conséquent, du DPNH, ont été infructueuses. Ceci pourrait d'ailleurs s'expliquer par empêchement stérique, le réactif ne pouvant avoir accès au substrat (voir schéma).

Cependant, en utilisant des quantités équimoléculaires d'enzyme et de substrat (ce qui revient à se placer bien au-dessous des concentrations saturantes), on devrait s'attendre à transformer pratiquement tout le substrat dans la forme cétonique intermédiaire. On devrait donc, quantitativement, retrouver sur le DPNH le tritium enlevé au substrat. Cette expérience, si elle était positive, apporterait la preuve d'un mécanisme d'oxydo-réduction et de l'intervention du DPN dans celui-ci.

Le rôle qui, dans ce mécanisme, incombe à l'uracile est d'être à la fois et de

façon réversible, accepteur d'hydrogène et donateur d'électron. Il semble hautement probable que, si tel est son rôle, le fait que l'uracile fasse partie de la molécule dans laquelle l'hexose est intégré et qu'il soit, par conséquent, placé dans les conditions stériques les plus favorables, doive lui conférer une grande spécificité dans la catalyse de la réaction d'épimérisation.

Cependant, on peut penser que d'autres composés, à condition d'être doués des mêmes propriétés essentielles, pourraient remplacer, au moins partiellement, l'uracile. En présence de tels catalyseurs, la réaction devrait pouvoir fonctionner avec les substrats non nucléotidiques (sucres libres ou phosphorylés). Selon que le composé choisi serait indifféremment « donateur-accepteur » ou préférentiellement « donateur » d'électron (*cf.* KARREMAN et coll., 1959), la réaction pourrait être complète, ou conduire seulement à la forme intermédiaire.

4.6 RÉSUMÉ

1) La composition enzymatique du « système galactose » a été exposée ainsi que le rôle de chacune des enzymes de ce système dans le catabolisme et l'anabolisme du galactose.

2) Les enzymes du métabolisme du galactose (galactokinase, Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase, UDPGal-4-épimérase) ont été mises en évidence et dosées spectrophotométriquement chez deux espèces de levures : *S. cerevisiae* et *S. fragilis*.

3) Les valeurs absolues obtenues ont été rapportées à deux enzymes indépendantes du « système -galactose », la glucose-6-phosphate déshydrogénase et la G-1-P/PP uridyltransférase. La validité des valeurs obtenues de cette façon a été discutée.

4) La comparaison des valeurs relatives ainsi obtenues a permis de mettre en évidence une plus grande activité des enzymes du métabolisme du galactose chez *S. fragilis* que chez *S. cerevisiae*, surtout en ce qui concerne la galactokinase et la Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase.

5) L'effet du 2-désoxygalactose sur le métabolisme, *in vitro* et *in vivo*, du galactose a été étudié. Il a été conclu que le désoxygalactose est probablement métabolisé par les enzymes du galactose jusqu'à sa transformation en 2-désoxyglucose-6-phosphate. Le mécanisme de son effet inhibiteur sur la respiration ou la fermentation du glucose comme sur celle du galactose serait ainsi à ramener à celui du 2-désoxyglucose.

6) Il a été suggéré que le 2-désoxygalactose, ou ses produits métaboliques (désoxygalactose-1-phosphate, UDP-désoxyglucose, UDP-désoxygalactose) pourraient être utilement étudiés en tant qu'inhibiteurs compétitifs des enzymes du métabolisme du galactose.

7) L'UDPGal-4-épimérase de la levure a été purifiée environ 150 fois à partir de *S. fragilis*, et la méthode décrite.

8) L'enzyme de levure est fluorescent. Il a été montré que la fluorescence est une propriété liée à l'activité enzymatique.

9) Par traitement de l'enzyme par le PCMB, fluorescence et activité disparaissent. L'activité, mais non la fluorescence, peut être récupérée à condition d'ajouter à l'enzyme transformée, DPN et cystéine.

10) La substance responsable de la fluorescence a été identifiée, par trois méthodes différentes, comme étant du DPN lié à l'enzyme de levure.

11) Un modèle moléculaire de l'UDPG a été construit. Sur la base d'une des structures possibles de la molécule et à la lumière des faits déjà connus, le mécanisme le plus probable de la réaction d'épimérisation a été reconsidéré.

12) Un nouveau mécanisme d'oxydo-réduction, à double catalyse, a été proposé, utilisant à la fois le DPN et le noyau de l'uracile comme accepteurs des deux atomes d'hydrogène enlevés au substrat. La réaction est rendue possible à l'aide d'une compensation des charges intervenant entre les deux noyaux Uracile-nucléotidique et DPN. Deux expériences destinées à tester la validité de ce schéma ont été suggérées.

V. — CONTRÔLE GÉNÉTIQUE DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE

Au cours de ce chapitre, le rôle des différents gènes connus qui contrôlent le métabolisme du galactose, sera examiné.

L'introduction donnera un aperçu des connaissances précédemment acquises concernant la génétique du métabolisme du galactose chez les levures. Les rôles respectivement attribués à chacun des trois gènes actuellement identifiés, seront exposés brièvement.

La partie expérimentale sera consacrée à l'examen du rôle de deux de ces gènes G_1 et G_2 . Il sera montré que le gène G_1 contrôle la biosynthèse de la galactokinase, tandis que le gène G_2 contrôle la biosynthèse d'un système que j'ai appelé « galactose-perméase ».

Quelques propriétés de la galactose-perméase de la levure (qui n'avait jamais été mise en évidence auparavant) seront examinées.

Il sera montré que la souche CH-1, diploïde, génotype $g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$, « galactose positive », incorpore le galactose, non seulement à l'état de sucre libre, mais le transforme en une forme de réserve, probablement le tréhalose.

Le rôle des gènes G_1 et G_2 sera examiné. De plus, il sera fait quelques remarques concernant l'importance physiologique de la galactose-perméase, le rôle possible des perméases dans le phénomène d'attaque préférentielle ainsi que le rôle que l'on peut attribuer à l'incorporation des sucres libres dans un « pool » de tréhalose intracellulaire.

Le contrôle génétique des autres réactions métaboliques du galactose, mis en évidence chez d'autres organismes, sera résumé très brièvement.

5.1 INTRODUCTION

Capacité de fermenter le galactose :

Le caractère « Capacité/Incapacité » de fermenter le galactose est bien connu chez les levures. Il a été couramment utilisé, de même que la capacité de fermenter d'autres hydrates de carbone, pour la classification de ces microorganismes.

Des deux espèces dont il est question dans le présent travail, *S. fragilis* est « galac-

tose-positive », c'est-à-dire capable de fermenter le galactose dans les conditions habituelles de ce test (1).

Le même test, appliqué à *S. cerevisiae*, conduit, selon les clones d'origine sauvage étudiés, à des réponses beaucoup plus variables. C'est ainsi que LODDER (1952) donne pour *S. cerevisiae* les caractéristiques fermentatives suivantes : Glucose (+), Maltose (+), Galactose (+), mais parfois faible ou (—), Lactose (—).

Ségrégation des caractères concernant le métabolisme des sucres :

Grâce à la méthode d'isolement des cellules et de dissection des asques à l'aide du micromanipulateur (WINGE et LAUSTEN, 1937) et à l'obtention d'hybrides par appariement de deux spores sexuellement compatibles (WINGE et LAUSTEN, 1938), WINGE et LAUSTEN, (1939) avaient clairement montré :

1) que toutes les cellules d'un clone issu d'une spore unique se comportent comme la cellule-mère en ce qui concerne leurs capacités fermentatives ;

2) que les hybrides interspécifiques, Raffinose (—) × Raffinose (—), Mélibiose (+) × Mélibiose (—), Sucrose (+) × Sucrose (—), sont tous positifs. La capacité de fermenter le glucide est donc un caractère dominant ;

3) qu'une ségrégation mendélienne simple, 2 : 2, pour chacun des caractères étudiés pouvait être démontrée par l'analyse des spores isolées individuellement à partir d'asques à quatre spores.

Mise en évidence de l'existence d'un gène concernant le caractère « slow » :

La possibilité de généraliser ce déterminisme héréditaire classique à l'ensemble des caractères contrôlant la fermentation des sucres chez les levures sembla remise en question lorsque LINDEGREN et coll. obtinrent des ségrégations irrégulières (ségrégations 3(+) : 1(—), et 4(+) : 0(—), à partir d'hybrides supposés différer par un seul gène ; LINDEGREN, 1946), à partir de croisements interspécifiques faisant intervenir les caractères « Fermentation du mélibiose » et « Fermentation du galactose » (LINDEGREN, SPIEGELMAN et LINDEGREN, 1944 ; LINDEGREN, 1945 ; SPIEGELMAN, LINDEGREN et LINDEGREN, 1945).

Afin d'expliquer ces résultats inattendus, obtenus surtout lorsque la sporulation avait lieu en présence de galactose, LINDEGREN et LINDEGREN (1946) proposèrent une théorie selon laquelle un facteur cytoplasmique auto-reproductible serait l'entité responsable de la synthèse de l'enzyme. Ce facteur serait doué d'une autonomie suffisante pour se maintenir pendant un certain nombre de générations en l'absence de l'allèle dominant initiateur de sa formation, à condition de se trouver continuellement en présence de l'inducteur.

WINGE et ROBERTS (1948) montrèrent que la plupart des ségrégations aberrantes observées par LINDEGREN pouvaient être expliquées par les données de la génétique classique. Au cours de leur étude systématique des conditions requises pour la manifestation du phénotype « slow » ils montrèrent que la différence entre le type « slow »

(1) Une souche est dite « positive » lorsqu'on peut observer un dégagement de CO₂ pendant les trois premiers jours de contact anaérobie avec ce sucre, au sein d'un milieu nutritif. Une souche sera « négative » si aucun dégagement de CO₂ ne se produit, quelle que soit la durée du contact. Il existe, d'autre part, des souches de type intermédiaire, ne produisant un dégagement qu'après une période de l'ordre d'une semaine et parfois même plus longue : ce dernier type est dit « slow ».

Les conditions de ce test permettent à la fois l'adaptation enzymatique, la croissance et éventuellement la sélection des mutants.

et le type « sauvage » est sous le contrôle d'un gène, mais qu'elle est de nature quantitative : l'allèle G (présent chez *S. cerevisiae*) provoque la fermentation du galactose dans un délai court (1 à 3 jours), tandis que l'allèle gs (présent chez *S. chevalieri*) requiert une période d'adaptation de l'ordre d'une semaine.

Lorsque l'adaptation a eu lieu les deux souches fermentent le galactose à une vitesse identique. Il ne s'agit donc pas d'une différence dans la quantité de « galactozymase » formée, mais dans la vitesse de formation de ce système enzymatique. SPIEGELMAN et de LORENZO (1952) arrivèrent aux mêmes conclusions.

SPIEGELMAN (1951) avait, par ailleurs, réfuté la suggestion de LINDEGREN (1949) et MUNKUR et LINDEGREN (1949) selon laquelle l'apparition de colonies de type « slow » pouvait être due à un processus de mutation suivi de sélection, à partir de cellules de génotypes « négatif », et montré qu'il s'agit d'un phénomène réversible, intéressant toutes les cellules de la population.

L'étude de la transmission, en absence de galactose, du caractère « slow » aux bourgeons issus d'une cellule isolée (SPIEGELMAN, de LORENZO et CAMPBELL, 1951) conduisit ces auteurs à formuler l'hypothèse suivante : en l'absence du gène responsable de leur biosynthèse, des particules hypothétiques, jouant le rôle de modèle, se trouveraient diluées par chaque génération cellulaire (1). La présence d'une seule particule par cellule serait toutefois capable d'assurer la formation d'une colonie « positive » (voir aussi, CAMPBELL et SPIEGELMAN, 1956).

Il est remarquable, comme le constatent WINGE et ROBERTS (1958) que seul le petit nombre de particules qui ont été postulées (de l'ordre de cent) conduit à éliminer la possibilité que l'enzyme elle-même puisse être l'élément cytoplasmique en question. Il suffirait d'admettre, qu'au lieu d'une particule unique il faut, pour assurer un phénotype (—) à une cellule de génotype « slow », un nombre minimum de molécules d'enzyme qui pourrait en ce cas être élevé — par exemple dix mille — pour que cette contradiction fût levée.

Mise en évidence de l'existence de plusieurs gènes complémentaires contrôlant le métabolisme du galactose :

En dehors des expériences qui ont été résumées précédemment, LINDEGREN et LINDEGREN (1947) mirent en évidence une ségrégation mendélienne simple pour un couple de caractères « capacité/incapacité » de fermenter le galactose. La manifestation phénotypique de ce gène (nettement négative lorsque ce gène est à l'état récessif) semble indiquer qu'il s'agit d'un gène distinct de celui déterminant le caractère « slow ».

ROMAN et coll. (1951) observèrent de même une ségrégation 2 : 2 pour un caractère concernant également la fermentation du galactose.

Des expériences préliminaires de HAWTHORNE avaient indiqué que les gènes étudiés par LINDEGREN et LINDEGREN (1947) et celui étudié par ROMAN et coll. (1951) n'étaient probablement pas alléliques.

D'autre part, LEUPOLD et HOTFINGER (1954), étudiant la ségrégation de différents caractères chez *S. cerevisiae*, obtinrent une ségrégation caractéristique de l'intervention de deux gènes complémentaires pour le caractère « fermentation du

(1) Cette conception est dérivée de l'hypothèse dite du « cytogène » formulée par LINDEGREN et LINDEGREN (1946).

galactose », présent dans leur stock. L'une des souches qui fut utilisée pour le croisement étant « galactose-positif », il fut supposé que l'autre partenaire (B15) était un double récessif.

DOUGLAS et CONDIE (1954) entreprirent une caractérisation préliminaire du rôle de chacun des deux gènes impliqués.

Des mutants haploïdes, provenant du stock de LINDEGREN (286 et 1426A) furent employés par ces auteurs. L'un d'eux fut trouvé complètement incapable de fermenter le galactose, et fut appelé g_1g_2 , tandis que l'autre, apparemment « négatif » lorsqu'il est essayé avec des concentrations en galactose inférieures à 0,5 p. 100, est cependant capable de fermenter le galactose à des concentrations supérieures

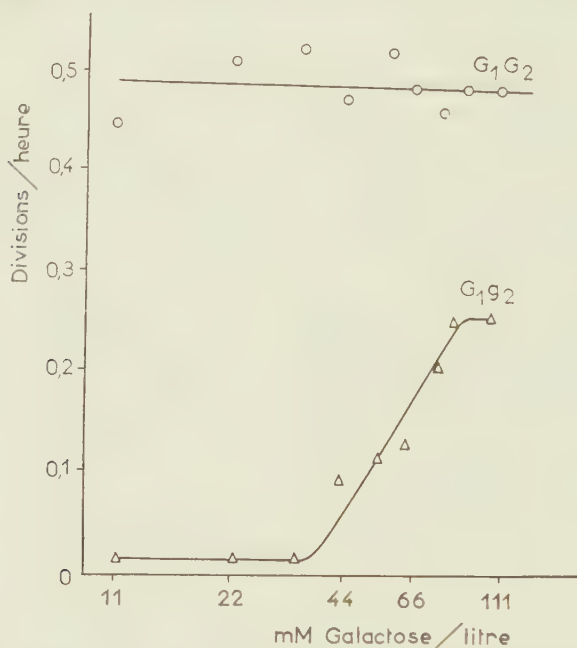


FIG. 24. — Croissance des souches de différents génotypes aux dépens du galactose.
D'après DOUGLAS et CONDIE, 1954.

à 2 p. 100 (voir figure 24). On attribue à cette souche génotype G_1g_2 . Le diploïde hétérozygote résultant du croisement de ces deux souches fermente le galactose aussi rapidement qu'une souche de type « sauvage ». Les asques sont de type : 0 : 4, 1 : 3, et 2 : 2 (positif : négatif), avec les fréquences attendues pour la ségrégation de deux gènes indépendants.

Étant donné l'incapacité totale de fermenter le galactose, manifestée par la souche de génotype g_1g_2 , il fut admis que l'allèle g_1 pouvait être responsable d'une déficience d'ordre métabolique, intéressant l'une des enzymes de la transformation du galactose.

D'autre part, DOUGLAS et CONDIE purent montrer que les extraits de souches portant l'allèle récessif g_2 — à condition d'avoir été cultivées préalablement sur une concentration suffisante de galactose — formaient à partir de ce substrat, la même

quantité d'esters phosphorylés que les extraits de cellules de génotype « sauvage » dans les mêmes conditions. Il fut donc supposé que le gène G_2 contrôle un mécanisme assurant la perméabilité des cellules envers le galactose.

Complémentarité. — Allélisme :

Afin d'être à même de coordonner les résultats de ces différents auteurs, HAWTHORNE entreprit le travail de clarification génétique qui s'imposait. Il montra (HAWTHORNE, 1956) que les trois gènes (G_1 - G_2 - G_3) sont complémentaires, la présence des trois allèles dominants étant nécessaire pour assurer une fermentation rapide du galactose.

Les tests d'allélisme permirent d'identifier les gènes impliqués dans les travaux précédemment cités. Il est apparu que les gènes G_1 et G_2 , étudiés par DOUGLAS et CONDIE (1954) sont également ceux présents dans le double récessif de LEUPOLD et HOTTINGER (1954). Par ailleurs, le gène présent dans le matériel de WINGE et ROBERTS (1948) et dénommé par ces auteurs g_s a été trouvé allélique avec le caractère « slow » étudié par LINDEGREN et ses collaborateurs (*cf.* LINDEGREN, SPIEGELMAN et LINDEGREN, 1944 ; LINDEGREN, 1945 ; SPIEGELMAN, LINDEGREN et LINDEGREN, 1945). Par analogie de nomenclature, HAWTHORNE nomma ce gène G_3 .

Il ressort du travail de HAWTHORNE que l'on connaît, par conséquent, à l'heure actuelle, trois gènes intéressant l'utilisation et la transformation du galactose par les levures.

Avant d'aborder la partie expérimentale, je rappellerai les rôles respectivement attribués à ces trois gènes :

G_1 — est supposé contrôler une réaction faisant partie du métabolisme du galactose.

G_2 — est supposé contrôler un mécanisme modifiant la perméabilité cellulaire envers le galactose.

G_3 — est supposé contrôler la vitesse (et peut-être le processus) de l'induction de la capacité de fermenter le galactose.

Seuls les caractères contrôlés par les deux premiers de ces gènes ont été particulièrement étudiés au cours du présent travail. Les génotypes des souches utilisées pour cette étude ont été déterminés par D. C. HAWTHORNE comme étant les suivants :

N° de la souche	État	Génotype	Phénotype
1 235/2b	Haploïde	$g_1G_2G_3$	Incapable de fermenter le galactose après adaptation à ce sucre.
1 238/5d	Haploïde	$G_1g_2G_3$	Capable de fermenter le galactose (après adaptation) seulement aux concentrations élevées de ce sucre.
1 213/4c	Haploïde	$G_1G_2g_3$	Capable de fermenter le galactose seulement après adaptation prolongée à ce substrat.
B 15	Haploïde	$g_1g_2G_3$	Incapable de fermenter le galactose après adaptation à ce sucre.
CH-1	Diploïde	$g_1G_2G_3$ $G_1g_2G_3$	Capable de fermenter et d'utiliser le galactose pour la croissance après quelques heures d'adaptation à ce sucre.

L'étude de ce matériel a permis de vérifier entièrement les hypothèses de départ. Il sera en effet montré que le gène G_1 contrôle la synthèse d'une enzyme du métabolisme du galactose, la galactokinase, tandis que le gène G_2 contrôle un système de nature enzymatique qui sera appelé « Galactose-perméase ».

5.2 DÉTERMINATION DU RÔLE DU GÈNE G_1

Caractérisation des enzymes par incorporation du ^{14}C -galactose dans les nucléotides uridyliques :

Afin de déterminer le rôle du gène G_1 , une première expérience a été effectuée qui consiste à comparer l'incorporation du galactose radioactif dans les nucléotides, catalysée par des extraits dialysés provenant, soit d'une souche « galactose-positive » de génotype $g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$ (CH-1), soit d'une souche de génotype $g_1G_2G_3$ (1235 2b).

Un contrôle préliminaire est effectué, consistant à mesurer l'activité du système complet additionné des différents extraits supposés déficients, afin de vérifier qu'il ne s'agit pas de la présence d'un inhibiteur dans ces extraits.

Les résultats de cette expérience, effectuée selon la technique décrite dans 3.10, sont consignés dans le tableau II.

TABLEAU II

Incorporation du ^{14}C -galactose dans la fraction nucléotidique (UDPGal et UDPG)

Activités comparées des souches de génotype $g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$ et $g_1G_2G_3$, induites.

Mélange d'incubation :

^{14}C -galactose (225 000 cpm/ μ mole)	0,5 μ mole
^{12}C -galactose	0,5 μ mole
ATP	1,7 μ moles
MgCl ₂	5,0 μ moles
UDPG	0,4 μ mole
ENa	25,0 μ moles
Cystéine neutralisée	10,0 μ moles
Extraits : selon les indications	
Tampon : Tris, pH 7,5, concentration finale 0,1 M	
Eau distillée : complément à 1 ml.	

Incubation : à 37°, arrêtée par ébullition pendant 2 minutes.

Adsorption des nucléotides : sur Norite (voir Techniques).

Radioactivité : mesurée sur une fraction aliquote de l'éluat.

Extraits (200 μ l)	Galactokinase ajoutée (100 μ l)	Gal-1-P/G-1-P uridyltransf. ajoutée (30 μ l)	m μ moles Galactose incorp./h et par mg prot.
$g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$ (CH-1)			
16,5 mg prot./ml	—	—	284
»	+	—	272
»	—	+	272
» (inact. à 100°, 2 min) +	—	+	< 1
$g_1G_2G_3$ (1 235/2b)			
5 mg prot./ml	—	—	< 1
»	+	—	370
»	—	+	< 1
» (inact. à 100°, 2 min) +	—	+	< 1

Pour que les extraits additionnés du système complet (^{14}C -galactose, ATP, Mg⁺⁺, UDPG, etc.) forment des nucléotides (UDPGal et UDPG) radioactifs, ils doivent

contenir au moins les deux premières enzymes du système : galactokinase et Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase. L'absence d'incorporation peut donc être due à l'absence de l'une ou de l'autre de ces enzymes (ou des deux à la fois).

Afin de permettre l'identification de l'enzyme absente, chaque extrait est également testé en présence de galactokinase ou de Gal-1-P/G-1-P uridyl-transférase ajoutées.

On voit, dans le tableau 11, que les extraits provenant de la souche CH-1 incorporent le galactose dans la fraction nucléotidique et que l'addition de l'une ou de l'autre des deux enzymes complémentaires n'augmente pas cette incorporation.

Au contraire, les extraits provenant de la souche 1235/2b n'incorporent qu'en présence de galactokinase ajoutée. Il peut donc être conclu d'une telle expérience que ces extraits possèdent la Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase, mais sont dépourvus de galactokinase.

Caractérisation spectrophotométrique des enzymes du métabolisme du galactose chez plusieurs souches de génotypes différents :

Une détermination quantitative spécifique de la Gal-1-P/G-1-P uridyl-transférase, de l'UDPGal-4-épimérase, ainsi que de la G-1-P/PP uridyltransférase, a été effectuée. Afin d'obtenir, dans une même expérience, une image complète, les 4 souches (représentant 4 génotypes différents) ont été analysées comparativement, après culture sur glucose ou sur galactose.

Les résultats concernant le caractère adaptatif de ces enzymes seront examinés dans le chapitre suivant. Il sera retenu ici (voir tableau 12) que la galactokinase est totalement absente des extraits des souches portant l'allèle récessif g_1 , ce que confirme l'expérience précédente. Ces souches possèdent, par contre, des activités comparables à celles de CH-1 pour les deux autres enzymes, Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase et UDPGal-4-épimérase.

Ces déterminations ont été effectuées soit sur des cellules cultivées en présence de glucose, « non-induites », soit en présence de galactose, « induites ». L'induction est effectuée par culture sur acétate + galactose ou par culture sur glucose, puis incubation avec le galactose (voir chapitre 6).

Les déterminations spectrophotométriques permettent, dans les conditions employées, de détecter la transformation de 10^{-5} μ mole de substrat par minute.

On voit donc que la quantité maximum de galactokinase qui pourrait être présente dans les extraits de 1235/2b est inférieure à 0,1 p. 100 de la quantité présente dans CH-1. La déficience en galactokinase, due à la présence de l'allèle g_1 est donc très prononcée, sinon totale.

5.3. DÉTERMINATION DU RÔLE DU GÈNE G_2

Il ressort des résultats présentés dans le tableau 12 que la souche 1238/5d de génotype $G_1g_2G_3$ possède, après culture prolongée en présence de galactose, les trois enzymes assurant le métabolisme de ce sucre, avec des activités comparables à celles de la souche CH-1. Cette souche ne présente, par conséquent, aucune déficience concernant les enzymes du métabolisme du galactose proprement dit.

TABLEAU 12

Dosage des enzymes du métabolisme du galactose

Activités comparées des souches de différents génotypes rapportées à 1 000 unités de G-1-P/PP uridylyltransférase :

(1 Unité = 10^{-4} μ mole de substrat transformé par minute et par mg de protéine).

Les dosages de galactokinase ont été effectués dans les mêmes conditions que celles décrites dans le tableau 11. La détermination à l'aide du galactose radioactif ne donne qu'une valeur minimum de l'activité galactokinase, car elle ne permet pas d'étudier la cinétique de la réaction. Toutefois cette méthode assure une sensibilité de l'ordre de 10^{-5} (μ moles/minute). L'incubation était de 60 minutes, mais pour l'homogénéité du tableau, les résultats ont été exprimés par minute. Les dosages de Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase, d'UDPGal-4-épimérase ainsi que de G-1-P/PP uridylyltransférase (enzyme de référence) ont été effectués selon les conditions décrites dans la partie technique (voir 3.9).

Génotype	Source de carbone pendant la culture	Galactokinase	Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase	UDPGal-4-épimérase
$g_1g_2G_3/G_1g_2G_3$	glucose	< 0,1	5	< 1
	acétate + galactose	50	550	159
$g_1C_2G_3$	glucose	< 0,1	< 1	< 1
	acétate + galactose	< 0,1	660	148
$G_1g_2G_3$	glucose	0,1	1	< 1
	acétate + galactose	47	350	158
$g_1g_2G_3$	glucose	< 0,1	< 1	2
	acétate + galactose	< 0,1	640	141

En raison de la forte tendance de 1238/5d à former des groupes de cellules, il n'a pas été possible de suivre la croissance de cette souche avec une précision satisfaisante. Celle-ci présente, toutefois, approximativement les mêmes caractéristiques que celles décrites par DOUGLAS et CONDIE (1954) pour d'autres souches portant l'allèle g_2 (voir figure 24) : croissance faible ou nulle aux concentrations de galactose inférieures à 1 mg/ml ; croissance comparable à celle de la souche témoin lorsque les concentrations de galactose atteignent 10 mg/ml.

Perméases chez les microorganismes :

Etant donné les résultats obtenus par DOUGLAS et CONDIE (1954), l'hypothèse selon laquelle la réaction contrôlée par le gène G_2 serait une « galactose-perméase » semblait très vraisemblable.

Avant d'entrer dans la partie expérimentale concernant cette question, il semble nécessaire de passer rapidement en revue les résultats acquis concernant les « perméases » bactériennes afin d'en dégager les critères permettant de caractériser l'existence éventuelle d'un tel système chez les levures portant l'allèle G_2 .

COHEN et RICKENBERG (1956), et RICKENBERG et coll. (1956) ont successivement montré l'existence, chez *E. coli*, de systèmes spécifiques de concentration vis-à-vis des acides aminés et des galactosides. Il serait en dehors du cadre de cet exposé de présenter une discussion détaillée des différentes théories qui ont été avancées pour expliquer les effets de concentration contre un gradient, observés avec différents organismes et de multiples métabolites.

Dans la revue que COHEN et MONOD (1957) ont consacrée à ce problème, il a été montré que l'hypothèse tendant à expliquer le phénomène de transport actif par la fixation sur des sites spécifiques (Schéma « stœchiométrique »), ne permet pas de rendre compte de tous les résultats d'une manière satisfaisante. Au contraire,

l'hypothèse selon laquelle le transport actif et sélectif de chaque métabolite serait dû à l'existence de systèmes spécifiques, de nature protéique, agissant selon un schéma « catalytique » est en accord avec l'ensemble des faits expérimentaux suivants :

1) *Concentration atteinte.* — L'importance des effets de concentration ⁽¹⁾ observés rend difficile la conception d'une fixation stœchiométrique — faute de pouvoir imaginer un nombre suffisant de sites spécifiques par cellule.

2) *Cinétique de concentration.* — La cinétique des phénomènes de concentration observée met en évidence un effet de saturation : les vitesses obtenues permettent de calculer des K_m apparents qui sont de l'ordre de grandeur attendu pour des réactions de type enzymatique. La vitesse initiale d'entrée est indépendante de la concentration en galactosides (*cf.* KEPES et MONOD, 1957).

De plus, la nature protéique des systèmes de concentration spécifique semble être établie grâce aux faits suivants :

a) *Inductibilité.* — Le fait que certain de ces systèmes sont inductibles permet de postuler leur nature protéique.

b) *Action des inhibiteurs de la synthèse protéique.* — Les analogues d'acides aminés, ou le chloramphenicol, inhibent la formation induite des systèmes de concentration spécifique.

c) *Mutants dépourvus de systèmes de concentration.* — De nombreux mutants ont été isolés qui sont incapables de concentrer un métabolite donné : mutants cryptiques. Dans le cas de la galactoside-perméase, il a été montré que ce caractère est sous le contrôle d'un seul gène. La biosynthèse de ces systèmes est donc placée, comme toute protéine cellulaire spécifique, sous contrôle génique.

La nature protéique de tels systèmes, jointe à la forte probabilité en faveur de leur fonctionnement selon le mode catalytique permet de les rattacher à la classe des catalyseurs spécifiques, de nature protéique : les enzymes. COHEN et MONOD (1957) ont attribué à ces systèmes de concentration spécifique le nom général de « perméases ».

Les expériences décrites ci-dessous ont trait à la mise en évidence d'une « galactose-perméase » chez le mutant galactokinase-négatif (génotype $g_1g_2G_3$), et à son absence chez le mutant de génotype $G_1g_2G_3$. Le mutant galactokinase-négatif a été choisi pour cette étude car il a l'avantage de ne présenter aucun métabolisme du galactose. Il sera montré, de plus, que dans le cas de la souche CH-1 (génotype $g_1G_2G_3 G_1g_2G_3$) les effets de concentration observés sont compliqués par la présence, chez cette souche, d'un métabolisme du galactose. Il sera montré en effet que cette dernière souche accumule, à partir du galactose, des réserves glucidiques présentant les caractéristiques du tréhalose.

Etude de la perméabilité des cellules de levure envers le galactose :

La perméabilité cellulaire envers le galactose a été mesurée d'après la technique déjà décrite (voir 3.10), sur des cellules de différents génotypes provenant, soit d'une culture sur glucose (cellules non-induites), soit d'une culture sur galactose (cellules induites).

(1) Jusqu'à présent ces systèmes de transport actif ont surtout été observés dans le cas où leur action se traduit par un effet de concentration du métabolite (ou de son analogue) à l'intérieur de la cellule. Cependant, les résultats de DOUDOROFF (1951), et DOUDOROFF et coll. (1956), par exemple, sont tout à fait compatibles avec l'existence de systèmes de transport actif qui ne concentrent pas. Dans ce cas, seule l'existence de mutants cryptiques permet de révéler l'existence de la perméase.

La figure 25 montre les résultats obtenus. Les constatations essentielles qui s'en dégagent sont les suivantes ⁽¹⁾ :

- 1) La perméabilité des cellules non-induites de la souche CH-1 diploïde (galactose-positive) est très faible.
- 2) Au contraire, les cellules de la même souche, ayant effectué leur croissance sur galactose, présentent une perméabilité très grande envers ce sucre.
- 3) La perméabilité au galactose des cellules induites de la souche portant l'allèle g_2 est très faible et à peine supérieure à celle des cellules de la souche CH-1 non-induites.

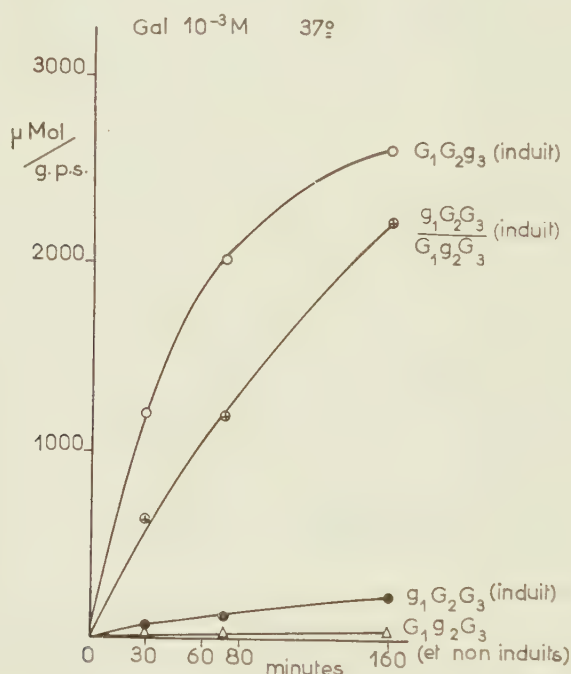


FIG. 25. — Incorporation intracellulaire du ^{14}C -galactose, dans les souches induites et non-induites de différents génotypes.
Galactose 10^{-3}M ; tampon TRIS pH 7,0, 0,1 M ; 37°C .

4) La perméabilité des cellules induites du mutant portant l'allèle dominant G_2 (génotype $g_1G_2G_3$) est de 8 à 10 fois supérieure à celle du mutant du génotype $G_1g_2G_3$.

5) La perméabilité des cellules induites du mutant galactokinase-négatif est néanmoins très inférieure à celle du diploïde induit.

6) Le mutant portant l'allèle récessif g_3 , induit, présente une perméabilité envers le galactose, au moins égale à celle du diploïde CH-1 induit.

Un certain nombre de conclusions peuvent être immédiatement déduites de ces constatations :

1) Il existe un système de transport actif du galactose permettant de concentrer ce sucre à l'intérieur de la cellule ⁽²⁾. La concentration intracellulaire atteinte

(1) Les données numériques seront présentées plus loin.

(2) Calculé sur la base : 1 mg p.s. = 2 μl Volume cellulaire interne (volume aqueux) (voir 3,10).

après 160 minutes représente environ 120 fois celle du milieu extérieur pour la souche $g_1G_2G_3$ et 1100 fois pour la souche CH-1.

2) Ce système de concentration est de caractère adaptatif, puisqu'il est absent des cellules non-induites (la cinétique de cette adaptation sera présentée dans le chapitre suivant).

3) La présence de ce système est sous le contrôle du gène G_2 , puisqu'il n'est pas formé dans les cellules induites portant l'allèle g_2 , bien que ces cellules possèdent toutes les enzymes du métabolisme du galactose (voir 5.2).

4) Les résultats obtenus en ce qui concerne les souches portant à la fois les allèles G_1 et G_2 (CH-1 et 1213/4c), c'est-à-dire capables, après induction, de métaboliser le galactose, laissent supposer que la capacité de concentrer le galactose est, soit sous le contrôle du même système que celui présent chez la souche 1235/2b, mais plus actif, soit sous le contrôle d'un système différent ou plus complexe.

5) Le couple d'allèles G_3/g_3 ne semble pas influencer la perméabilité induite envers le galactose.

Caractéristiques principales du système de transport actif du galactose.

Le système de concentration présent dans la souche galactokinase-négative sera considéré, dans la suite de ce travail, comme correspondant à la « galactose-perméase » « vraie » de *S. cerevisiae*. Les effets de concentration observés chez la

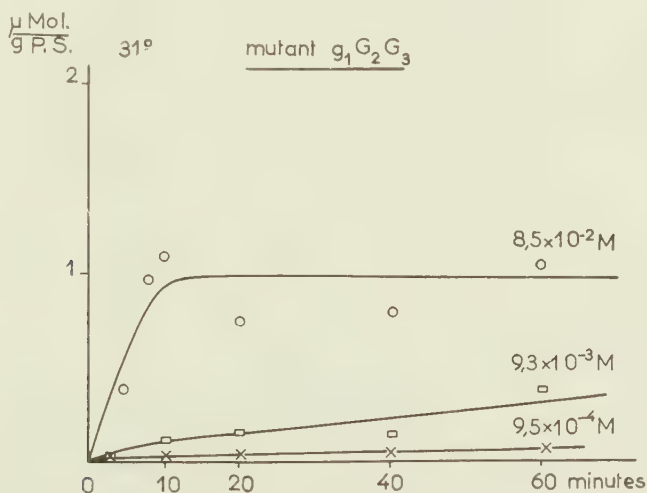


FIG. 26. — Concentration en galactose intracellulaire atteinte en fonction du temps et pour plusieurs concentrations externes de galactose. Expérience effectuée à 31°C.

souche CH-1, de génotype $g_1G_2G_3/G_1G_2G_3$ (galactose-positive) seront étudiés plus loin.

1) *Vitesse de concentration.* — La figure 26 représente la cinétique de pénétration du galactose pour la souche de génotype $g_1G_2G_3$ (1235/2b), incubée avec trois concentrations différentes de ^{14}C galactose : 10^{-3} , 10^{-2} , et 10^{-1} M. Les résultats obtenus dans plusieurs expériences de ce type ont permis de tracer le graphique

de la figure 27 dans lequel les vitesses maxima ⁽¹⁾ sont portées en fonction de la concentration extérieure. La courbe coupe l'axe des ordonnées pour une valeur que l'on peut considérer comme la « vitesse maximum » du système (entre 28 et 37°) et qui est de l'ordre de 1 m mole par minute et par g poids sec.

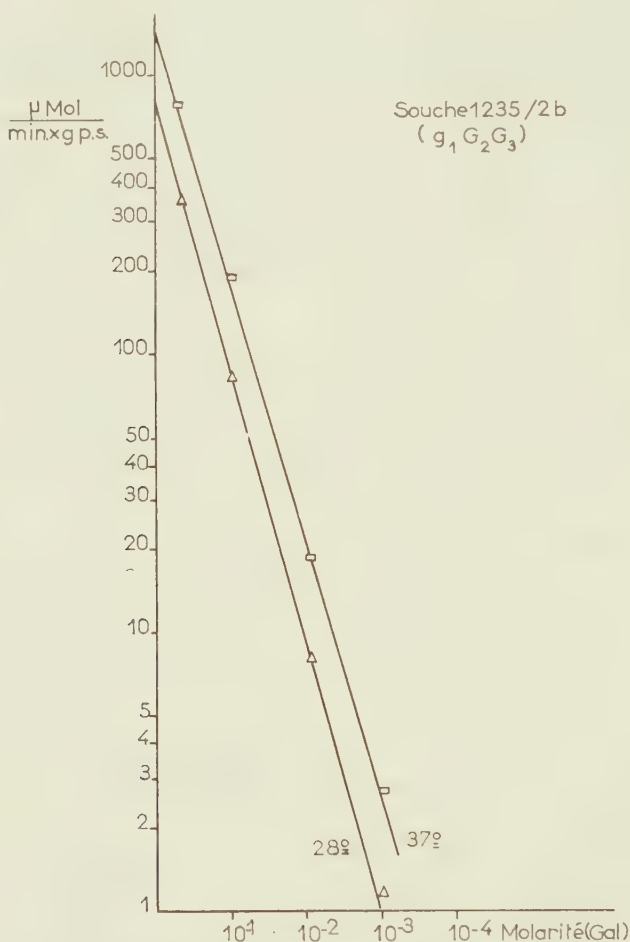


FIG. 27. — Variation de la vitesse de pénétration du galactose en fonction de sa concentration extérieure, à 28°C et 37°C. Souche galactokinase-négative (génotype $g_1G_2G_3$).

On voit que jusqu'à la concentration 0,5 M, on ne semble pas encore avoir atteint la saturation du système.

En effectuant les mesures sur des temps très courts, il est possible de se faire une idée plus précise des vitesses initiales. La figure 28 représente les résultats d'une expérience effectuée à 37° en présence de galactose 10^{-1} M. La vitesse initiale obtenue est de 590 μmoles par minute et par g de poids sec.

⁽¹⁾ Les vitesses maxima ont été calculées, d'une manière approximative, en traçant la tangente à l'origine ; ces vitesses sont exprimées en μmoles de galactose accumulées par minute et par g de poids sec.

Galactose externe $10^{-1}M$ - $31^{\circ}C$ - Souche galactokinase négative
($g_1 G_2 G_3$)

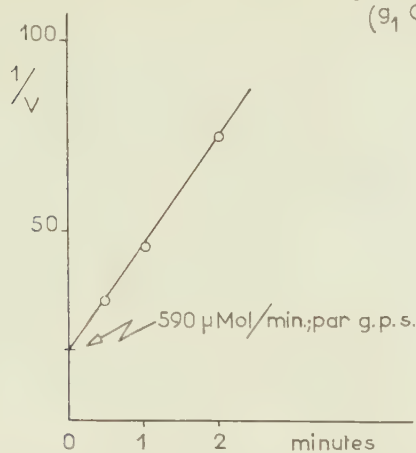


FIG. 28. — Vitesse initiale d'« entrée » du galactose.
Galactose externe $10^{-1}M$; $31^{\circ}C$; souche galactokinase-négative ($g_1 G_2 G_3$).



FIG. 29. — Effet de concentration du galactose chez la souche galactokinase-négative
(génotype $g_1 G_2 G_3$).

2) *Concentration intracellulaire atteinte.* — La figure 29 donne les concentrations intracellulaires atteintes dans la souche galactokinase-négative après 10 minutes de contact avec le ^{14}C -galactose (calculées comme précédemment), en fonction de la concentration extérieure. Cette droite coupe l'axe des ordonnées en un point qui correspond à une valeur de 4 à 5 M qui peut être considérée comme la concentration maximum possible du galactose intracellulaire.

3) *Influence de la température.* — La figure 30 montre que la température influence considérablement l'activité du système de concentration du galactose, alors qu'elle n'influence que très peu la perméabilité des cellules non-induites.

Les valeurs approximatives de Q_{10} entre 15 et 35° (accroissement de la vitesse en fonction d'une différence de température de 10°) est de l'ordre de 3 pour les cellules induites et très inférieure pour les cellules non-induites : environ 0,5.

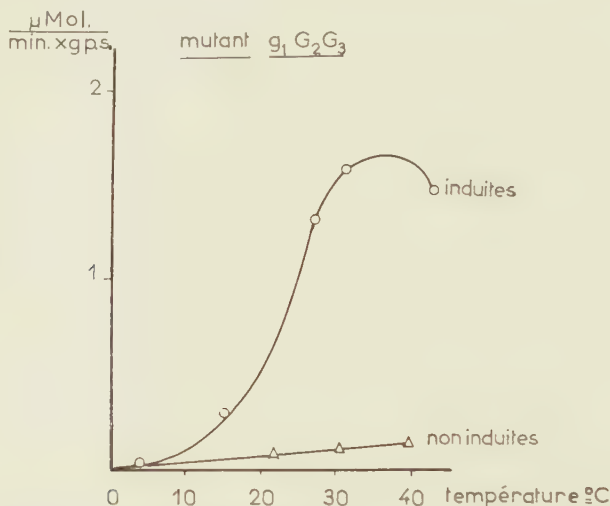


FIG. 30. — Influence de la température sur la vitesse de concentration du galactose chez la souche galactokinase-négative ($g_1G_2G_3$) adaptée et non-adaptée.

Ces valeurs suggèrent que la pénétration du galactose (après induction) est catalysée par une réaction de type enzymatique. Au contraire, la perméabilité des cellules non-induites, on raison de son Q_{10} bas, est plus probablement de nature non-enzymatique.

Conjointement avec le fait que le système est de nature adaptative il semble que l'on puisse conclure à l'existence chez ces souches d'une « galactose-perméase ».

4) *Effet du glucose.* — Le glucose ajouté au galactose en concentration équimoléculaire, diminue considérablement (57 p. 100) la quantité de galactose incorporée en fonction du temps, comme le montre la figure 31.

5) *Nature du produit concentré.* — Les cellules, après incubation de 15 minutes avec le galactose radioactif (dans les conditions habituelles), sont extraites par l'eau bouillante. Le liquide surnageant concentré est chromatographié dans plusieurs systèmes de solvants. Les taches sont révélées par radioautographie et par les réactions colorées des sucres (voir la partie technique : 3.10 et 3.13).

L'extrait provenant des cellules incubées de 1235/2h, contient un sucre radioactif dont le R_f ne se distingue pas de celui du galactose pur (voir figure 32).

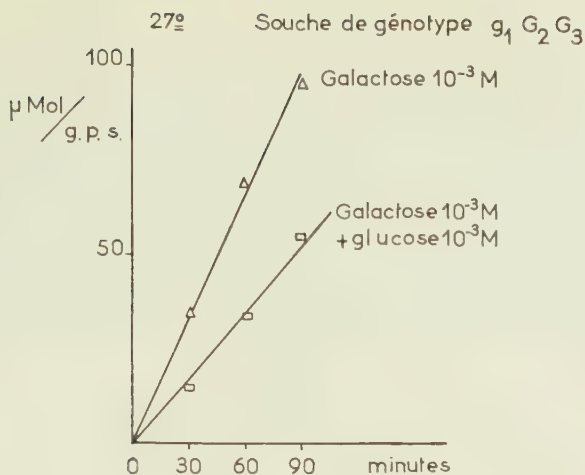


FIG. 31. — Effet du glucose sur la pénétration du galactose.
Souche de génotype $g_1 G_2 G_3$; 27°C.

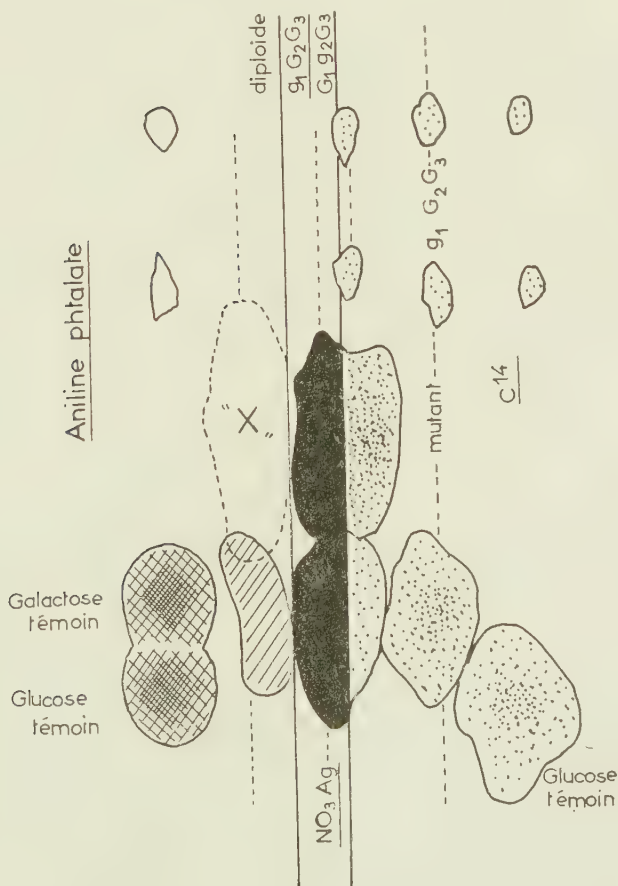


FIG. 32. — Chromatographie des extraits de souches de différents génotypes
après incubation en présence de ^{14}C galactose.

Solvant : Pyridine-Acétate d'éthyle-Eau (voir 3.13). Le chromatogramme a été découpé en bandes, l'une étant révélée par le phthalate acide d'aniline, l'autre par le nitrate d'argent ammoniacal ; l'emplacement des composés radio-actifs a été révélé par autoradiographie.
Souche : diploïde CH-1 et 1235/2b ($g_1 G_2 G_3$).

Effet de concentration chez la souche galactose-positive (CH-1, génotype $g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$).

La figure 32 montre que le produit majeur s'accumulant dans les cellules de génotype sauvage n'est pas du galactose, mais semble être un sucre non-réducteur, puisqu'il donne une réaction faible ou nulle avec le phthalate acide d'aniline. Toutefois, sa réaction positive avec le nitrate d'argent ammoniacal indique qu'il s'agit toujours d'un poly-ol. Son R_f est légèrement inférieur à celui du galactose (voir figure 33).

Les R_f observés ne peuvent correspondre qu'à un disaccharide. En effet, tous les tri- ou poly-saccharides connus présentent des R_f plus bas dans les systèmes de solvants employés.

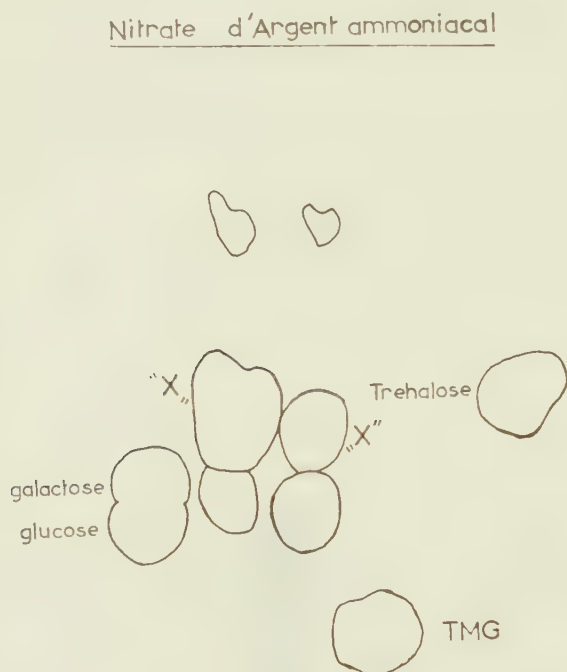


FIG. 33. — Chromatographie de l'extrait aqueux de la souche de génotype $g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$, après incubation avec du ^{14}C galactose.
Solvant : Pyridine-Acétate d'éthyle-Eau (voir 3.1.2)
Révélation au Nitrate d'argent ammoniacal.

Il n'existe pas de disaccharide non-réducteur connu, galactose-galactose ou galactose-glucose, mais il existe un disaccharide non réducteur, glucose-glucose, présent en quantité importante chez la levure, le tréhalose. Or, le tréhalose, chromatographié dans les mêmes conditions que précédemment, présente un R_f identique à celui de la tache radioactive, non réductrice de nature inconnue (voir figure 33).

L'une de ces taches a été éluée, hydrolysée, et le produit de l'hydrolyse chromatographié à nouveau. Une seule tache, dont le R_f est semblable à celui du glucose, a pu être mise en évidence à partir de cet hydrolysats (figure 34).

Ces résultats ne doivent toutefois être considérés que comme préliminaires. En effet, les quantités de produit récupérées après ces diverses manipulations étaient

très faibles. De plus, les R_f du glucose et du galactose, dans tous les systèmes de solvants employés, sont trop voisins pour permettre une conclusion définitive sur la seule base des résultats chromatographiques. Une identification plus poussée de cette substance n'a pu encore être entreprise.

Cependant, l'ensemble des résultats obtenus jusqu'à présent, suggère fortement que le produit majeur concentré par la souche CH-1 pourrait être du *tréhalose*.

On voit que la présence des enzymes du métabolisme du galactose conduit, chez cette souche, à l'accumulation d'un produit dont la formation requiert la participa-

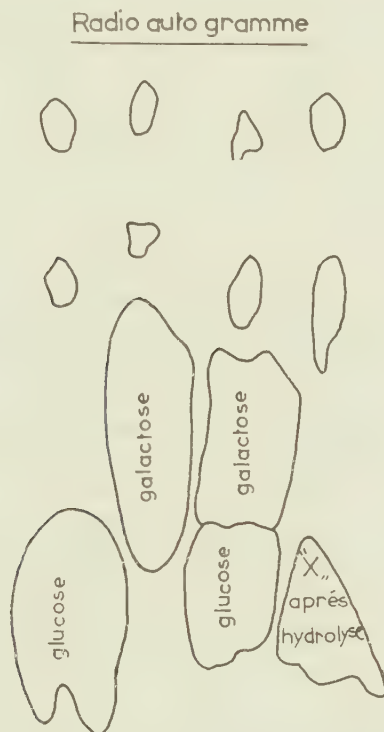


FIG. 34. — Autoradiogramme du composé concentré par la souche CH-1, hydrolysé.
Solvant : Pyridine-Acétate d'éthyle-Eau (voir 3.13).

tion de toutes ces enzymes. En effet, le tréhalose (glucose-glucose) exige la transformation du galactose en glucose-1, ou 6-phosphate (voir 4.1).

La vitesse initiale d'accumulation, exprimée en ^{14}C -galactose (mesurée dans les mêmes conditions que précédemment), conduit à une valeur de : 1670 μmoles par minute et par g. poids sec. Cette valeur est supérieure à celle obtenue avec le mutant galactokinase-négatif. On peut se demander si cette valeur ne représente pas la vitesse initiale maximum d'« entrée » catalysée par la galactose-perméase. En effet, dans ce cas, le galactose intracellulaire, résultant de l'activité de ce système galactose-perméase, se trouve continuellement soustrait pour être transformé en tréhalose, empêchant ainsi la valeur d'équilibre propre à la galactose-perméase d'être atteinte.

Le glucose inhibe l'accumulation du tréhalose chez la souche CH-1. Les

valeurs présentées dans le tableau 13 montrent que cette inhibition peut devenir à peu près totale lorsque la concentration du glucose est 100 fois plus élevée que celle du galactose.

TABLEAU 13
Effet du glucose sur la concentration du galactose par la souche CH-1
Incubation pendant 5 minutes à 25°

Galactose (C ¹² + C ¹⁴)	Glucose (C ¹²)	Galactose concentré (μmoles/g.p.s.)	Inhibition %
10 ⁻³ M	—	131	—
10 ⁻³ M	10 ⁻³ M	89	32
10 ⁻³ M	10 ⁻² M	28	79
10 ⁻³ M	10 ⁻¹ M	12	91

5.4 DISCUSSION

Rôle du gène G₁.

Les résultats de l'étude comparée de l'activité des enzymes du métabolisme du galactose chez les souches de différents génotypes sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle le couple d'allèle G₁/g₁ contrôle la biosynthèse induite de la galactokinase. L'absence d'activité galactokinase chez la souche portant l'allèle g₁ peut être considérée comme complète. En effet, la sensibilité des méthodes utilisées aurait permis la détection d'une activité de l'ordre de 0,1 p. 100 de l'activité des cellules induites portant l'allèle G₁. Ces résultats sont en accord avec ceux de NELSON (1955) qui avait montré que l'activité galactokinase (mesurée par formation d'esters phosphorylés stables) est fonction du nombre d'allèles G₁ présents dans les levures tétraploïdes.

Le gène G₁ ne modifie pas la synthèse ou l'activité des autres enzymes du galactose : les activités de la Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase, de l'UDPGal-4-épipimérase et de la Galactose-perméase, trouvées dans les cellules ayant proliféré en présence de galactose, sont du même ordre de grandeur en présence des allèles G₁ ou G₂. Il sera montré dans le chapitre suivant que la vitesse de leur biosynthèse induite est la même dans les deux cas. Le gène G₁ semble donc contrôler de manière absolue la biosynthèse de la galactokinase. De plus, il n'intervient pas dans le contrôle des autres enzymes du métabolisme qui ont été étudiées. Ceci constitue une illustration supplémentaire de la théorie de BEADLE (1945) : « un gène — une enzyme ».

D'autre part, le fait que le mutant de génotype g₁G₂G₃ soit incapable d'utiliser le galactose pour sa croissance, amène à la conclusion qu'il n'existe pas chez *S. cerevisiae* d'autre voie métabolique de l'utilisation du galactose que celle qui a été décrite au chapitre 4.

Rôle du gène G₂.

Galactose-perméase. — La mesure de la perméabilité envers le galactose des cellules de différents génotypes a permis de mettre en évidence l'existence d'une galactose-perméase dans les souches portant l'allèle G₂. Selon les méthodes employées, le produit concentré par la souche de génotype g₁G₂G₃ correspond à du galactose libre.

Au contraire, la souche portant l'allèle g_2 , cultivée en présence de galactose, se montre incapable de concentrer ce sucre.

Les propriétés inductibles de ce système suggèrent sa nature protéique. Son activité catalytique l'apparente, de même que les perméases déjà connues (voir COHEN et RICKENBERG, 1950 ; RICKENBERG et coll., 1956), à un système enzymatique.

Il semble donc que le gène G_2 contrôle, chez *S. cerevisiae*, la biosynthèse induite d'un système de nature enzymatique appelé « galactose-perméase ».

Il existe toutefois, chez la souche de génotype $G_1g_2G_3$, une activité résiduelle (tableau 14) variable selon les conditions, mais pouvant atteindre un effet de concentration de l'ordre de deux fois par rapport à la concentration extérieure. La variation, en fonction de la température, de la capacité d'incorporer le galactose radioactif, correspond, chez cette souche, à un Q_{10} de 3. Ceci montre qu'il s'agit probablement d'une activité de nature enzymatique et non d'un accroissement de la perméabilité physique dont le Q_{10} est 0,5 (chez les levures non-adaptées) (voir fig. 30).

La présence des enzymes du métabolisme du galactose dans cette souche, après induction, pourrait permettre une accumulation ménagée des produits de son métabolisme, pendant l'incubation avec le galactose radioactif.

La nature du produit concentré par cette souche n'a pas été établie. Il n'est donc pas possible de dire si l'activité répond au fonctionnement des enzymes du métabolisme du galactose ou à une faible biosynthèse de la galactose-perméase, c'est-à-dire si la présence de l'allèle g_2 correspond ou non à une perte totale de l'activité perméasique.

En tous cas, de même que pour le gène G_1 , le gène G_2 ne semble pas affecter la biosynthèse, ou l'activité, des autres enzymes du métabolisme du galactose, comme il ressort des résultats présentés dans les chapitres 4 et 6.

Perméabilité physique et importance physiologique de la galactose-perméase.

Les concentrations intracellulaires en galactose atteintes dans les cellules non-induites (reproduites dans le tableau 14) permettent d'estimer le volume cellulaire perméable à ce sucre à environ 50 à 70 p. 100 du volume total. Ceci correspond d'une manière satisfaisante à la valeur de 66 p. 100 déterminée par d'autres méthodes (LINDENBERG et coll., 1949) qui a été adoptée pour tous les calculs effectués ici.

Les résultats résumés dans les tableaux 14 et 15 permettent d'attirer l'attention sur un point important de la physiologie intracellulaire des levures.

TABLEAU 14
Perméabilité des cellules non induites

Souches	CH-1	1 235/2b	Résultats de BURGER et coll.
Température	28°	28°	30°
Concentration extérieure du galactose	$10^{-3}M$	$10^{-3}M$	$3 \times 10^{-1}M$
Concentration intracellulaire après 10 min.	$1,0 \times 10^{-3}M$	$0,37 \times 10^{-3}M$	—
Après 90 min.	$3,0 \times 10^{-3}M$ (1)	$0,7 \times 10^{-3}M$	$1,4 \times 10^{-1}M$

(1) Cette valeur plus élevée peut être due à un début d'adaptation pendant la durée de l'incubation.

TABLEAU 15

Vitesses d'incorporation du galactose dans différentes conditions μ moles par minute et par gramme de poids sec

Température	Galactose	10 ⁻³ M		10 ⁻¹ M
		28°	37°	28°
<i>Souches induites :</i>				
$g_1G_2G_3$		1,0	2,5	82
$G_1g_2G_3$		0,11	0,3	—
$g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$ (CH-1).....		8,0	25	240
<i>Souches non-induites :</i>				
$g_1G_2G_3$		0,07	0,09	8,5
$G_1g_2G_3$		0,07	0,09	—
$g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$ (CH-1).....		0,16	0,25	18,0
<i>S. cerevisiae non induit (selon BURGER et coll., 1959).</i>				
Galactose 3 $\times$ 10 ⁻³ M, 30°				6,7

Les cellules de levure, adaptées au galactose, sont capables de métaboliser ce substrat par respiration ou fermentation aussi bien que le glucose, c'est-à-dire avec un QO_2 optimum d'environ 120 et un QCO_2 optimum d'environ 300 (voir chapitre suivant). Ces valeurs correspondent à la consommation de 15 μ moles par g de poids sec et par minute pour la fermentation, lorsque la concentration du galactose est 0,1 M.

Le tableau 15 montre que les valeurs trouvées au cours de ce travail, aussi bien que celles trouvées par d'autres auteurs (BURGER et coll., 1959), pour les vitesses de pénétration du galactose dans les cellules de *S. cerevisiae* non-induites se situent entre 6 et 18 ⁽¹⁾ μ moles par g de poids sec et par minute, pour une concentration extérieure de 10⁻¹ M.

On voit donc que la « perméabilité physique » des cellules envers le galactose risquerait d'être limitante pour la respiration de ce sucre. Elle est, en tous cas, très inférieure à la vitesse de pénétration requise pour assurer les QCO_2 observés. Il semble par conséquent évident, à priori, que l'existence d'un mécanisme assurant une perméabilité accrue envers ce substrat devait être postulée (à moins d'admettre que la localisation des enzymes fermentaires soit telle qu'elles puissent être saturées malgré la faible concentration). En fait, les valeurs trouvées, même après induction de la galactose-perméase, sont du même ordre de grandeur que celles requises pour satisfaire une fermentation optimum du galactose. Il est donc concevable que, dans certains cas, le fonctionnement de la galactose-perméase puisse être le facteur limitant de la fermentation du galactose par *S. cerevisiae*.

Sols et coll. (1958) ont signalé l'existence d'une « hexose-transportase » chez les levures « Sauternes » qui serait la réaction limitant la fermentation des hexoses tels que glucose, fructose et mannose.

(1) Il est possible que la valeur : 18 μ moles par g poids sec et par minute, trouvée pour la souche galactose-positive CH-1, non-induite, ne corresponde pas seulement à sa perméabilité physique envers le galactose, mais reflète un certain niveau de galactose-perméase constitutive (voir chapitre 6).

Utilisation préférentielle.

Au cours du phénomène de diauxie, mis en évidence par MONOD (1942), on observe, lorsqu'un microorganisme dispose de deux sources carbonées, l'utilisation préférentielle de l'un des deux substrats, l'utilisation de second substrat ne commençant qu'après épuisement du premier.

On connaît le rôle inhibiteur du glucose (ou de toute substance énergétique dont le métabolisme est suffisamment rapide, NIEDHART et MAGASANIK, 1957) sur la biosynthèse induite des enzymes. Dans le cas où l'utilisation de l'un des substrats met en cause des enzymes constitutives (le glucose, par exemple), tandis que l'utilisation de l'autre substrat exige la biosynthèse induite d'une ou plusieurs enzymes, on doit s'attendre à un effet de diauxie.

Toutefois, dans les cas où les deux systèmes de dégradation sont constitutifs, ou bien lorsqu'il y a eu pré-induction, la compétition des deux substrats au niveau des perméases pourrait également provoquer l'utilisation préférentielle de l'un des deux substrats.

Dans le cas présent (inter-relation glucose-galactose) la pénétration du glucose ne peut pas être normalement catalysée par la galactose-perméase puisque celle-ci n'est présente qu'après induction par la galactose. Cependant, l'affinité du glucose pour la galactose-perméase, une fois celle-ci induite, est capable d'inhiber la pénétration du galactose.

Ces résultats montrent que, même dans certains cas où les cellules possèdent tout l'équipement enzymatique nécessaire pour attaquer conjointement deux substrats, l'existence d'effets compétitifs au niveau des perméases peut avoir pour résultat que l'un seulement des deux substrats sera attaqué préférentiellement.

Formation et accumulation de « tréhalose » à partir du galactose incorporé dans la souche CH-1.

Bien que la substance concentrée par le diploïde CH-1 n'ait pas été déterminée d'une manière définitive, les indications en faveur de son identité avec le tréhalose semblent suffisamment suggestives pour autoriser la discussion du rôle que cette substance peut remplir dans l'assimilation du galactose.

Les travaux de TREVELYAN et coll. (*cf.* TREVELYAN, 1958) ont apporté de nombreuses indications concernant l'importance du tréhalose en tant que substance de réserve chez les levures. Il en sera retenu les points suivants :

1) Le tréhalose n'est pas essentiel au maintien de la structure cellulaire, comme semblent l'être, à des degrés divers, les autres glucides de la levure : glucanes, mannanes, et glycogène, puisque les cellules de la levure peuvent, sans aucun dommage apparent, en être totalement dépourvues.

2) Dans des conditions de métabolisme intense des glucides (surtout en aérobiose et en absence d'une source azotée), le tréhalose peut représenter jusqu'à 40 p. 100 des réserves carbonées de la levure.

3) Le tréhalose semble être en équilibre dynamique avec le métabolisme d'hexoses tels que glucose, fructose, sucrose, mannose. L'utilisation de ces sucres s'accompagne tout d'abord d'une dégradation puis d'une re-synthèse du tréhalose intracellulaire. Un échange intense peut être mis en évidence grâce à l'utilisation, soit des sucres radioactifs, soit d'un marquage préliminaire du « pool » de tréhalose.

Il avait déjà été suggéré par WILLSTÄTTER et RONDEWALD (1937) que le passage par le glycogène pouvait constituer la première étape du métabolisme du glucose. On peut se demander si tel n'est pas le cas du tréhalose. Les expériences d'incorporation de la radioactivité provenant du galactose dans le composé correspondant au tréhalose, chez la souche CH-1, semblent l'indiquer. En effet, dans certains cas, la radioactivité retrouvée dans la tache « tréhalose » représentait environ 90 p. 100 de la radioactivité incorporée.

Dans ces conditions (galactose en excès, absence de croissance, temps d'incubation relativement court), le catabolisme du galactose ne semble donc soustraire qu'une part très faible, ou nulle, du galactose incorporé. Un phénomène semblable a déjà été observé à plusieurs reprises au cours de l'utilisation du glucose par les

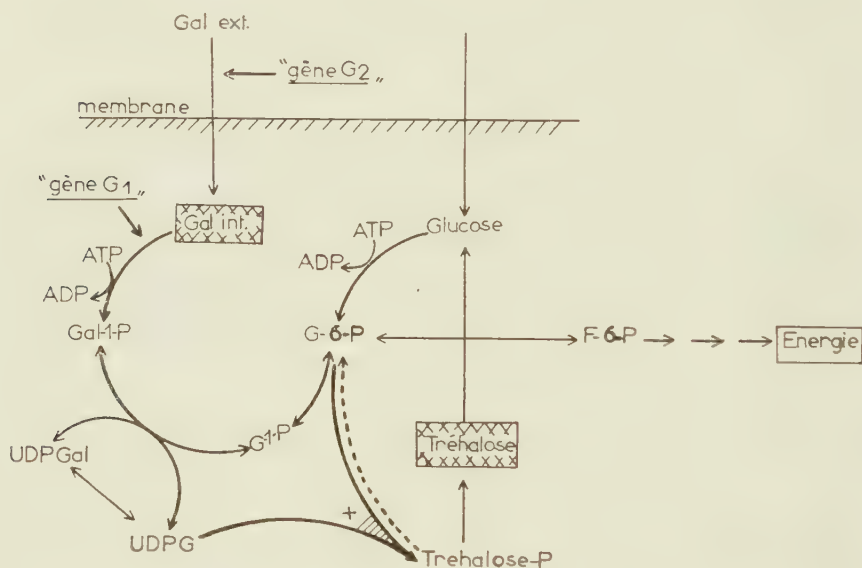


Schéma général du métabolisme du galactose chez *S. cerevisiae*

FIG. 35. — Schéma général du métabolisme du galactose chez *Saccharomyces cerevisiae* ; lieu d'intervention des gènes G_1 et G_2 .

levures. En particulier, WINZLER (1940) a pu montrer qu'en aérobiose et dans certaines conditions, 74 p. 100 du glucose métabolisé peut être « assimilé ».

Dans ces conditions, le schéma du catabolisme du galactose, chez les levures, tel qu'il avait été précédemment décrit (voir figure 7), doit être complété. En effet, le glucose (provenant du galactose) ne serait pas le produit exclusif de l'activité de la Gal-1-P G-1-P uridylyltransférase, comme cela a été admis jusqu'à maintenant. La réaction d'épimérisation : $UDPGal \rightleftharpoons UDPG$ ne serait plus seulement catalytique (resynthèse de l'UDPG), mais devrait fournir la quantité stœchiométrique d'UDPG, nécessaire à la biosynthèse du tréhalose ($UDPG + G-6-P \rightarrow$ Tréhalose $6-P + UDP$). Le schéma de la figure 12 devrait alors être remplacé par le schéma de la figure 35.

On voit que ce schéma permet d'expliquer l'existence de deux « pools » intracellulaires formés à partir du galactose : l'un est le pool du galactose libre résultant de l'activité de la galactose-perméase, seule présente dans la souche galactokinase-négative ; l'autre est le pool du tréhalose qui ne peut être alimenté qu'après isomérisation du galactose en glucose et n'est, par conséquent, présent que chez les souches capables de métaboliser le galactose.

La dépense énergétique exigée par la constitution de ce pool (deux ATP supplémentaires, l'un pour former l'UDPG consommé, l'autre pour phosphoryler l'un des résidus de glucose, après hydrolyse du tréhalose) ne serait vraiment intéressante qu'en aérobiose. En anaérobiose, le rendement serait moins efficace puisqu'il faudrait consommer trois ATP pour en reformer quatre ⁽¹⁾, ce qui ne semble pas très rentable. Ceci est en accord avec le fait que c'est en aérobiose seulement qu'on observe la constitution *de novo* d'un « pool » de tréhalose par les levures (voir TREVELYAN, 1958).

Rappelons que ce « pool » de tréhalose n'est pas spécifique du métabolisme du galactose, mais peut être rechargé à partir d'autres sucres, fructose, mannose, etc.

Le fait que les levures de génotype $G_1g_2G_3$ (perméase-négatives) n'incorporent pas la radioactivité du galactose dans le tréhalose, indique que des concentrations intracellulaires élevées de galactose sont probablement nécessaires pour la constitution de ce pool.

La constitution d'un « pool » de tréhalose peut présenter deux avantages pour la cellule :

1) Il a été signalé par plusieurs auteurs (voir TREVELYAN, 1958) que le tréhalose semble être relativement peu dégradé *in vivo*, chez la levure, à moins de se placer dans des conditions de carence carbonée. La possibilité de convertir différents sucres en tréhalose permettrait donc, lorsqu'il y a abondance, de les mettre à l'abri des dégradations enzymatiques.

2) L'existence d'une galactose-perméase occasionne probablement, aux concentrations extérieures élevées de galactose, une forte pression osmotique intracellulaire. La transformation du galactose en tréhalose constituerait, de ce point de vue, une soupape, permettant de diminuer la pression osmotique de moitié.

Remarques concernant le rôle du gène G_3 :

Aucune des expériences effectuées au cours de ce travail n'a eu pour but de déterminer le rôle de ce gène. Toutefois, le mutant de génotype $G_1G_2g_3$ ayant été inclus dans quelques expériences, il a pu être montré qu'après induction, les cellules de ce génotype incorporent le ^{14}C -galactose en quantité au moins égale, sinon supérieure, à celle que l'on observe dans le cas du diploïde CH-1. On sait, d'autre part, que les souches portant l'allèle g_3 sont capables, après induction, de métaboliser et d'utiliser le galactose pour la croissance, aussi bien que des souches de génotype sauvage (voir l'introduction de ce chapitre 5.1).

Ceci est en accord avec l'hypothèse (voir 5.1) selon laquelle le gène G_3 exerce son action sur un type de régulation différent d'une réaction métabolique proprement dite (formation ou activation d'un « template » ; antagonisme vis-à-vis d'un répresseur ; induction d'une perméase spécifique, etc.). On pourrait en effet penser

⁽¹⁾ Il est généralement admis que le rendement de la respiration se situe aux environs de 12 ATP/glucose, tandis que celui de la fermentation est de 4 ATP/glucose.

que la galactose-perméase, bien qu'étant normalement active une fois formée, est induite avec une cinétique très lente (*cf.* COHN, 1957). Ceci expliquerait d'ailleurs la cinétique exponentielle de l'induction de la capacité de fermenter le galactose chez ces souches. En effet, en l'absence d'une perméase active, la quantité d'énergie serait limitante et, au fur et à mesure que la perméase se formerait, la cinétique s'accélérait, jusqu'au moment où l'apport énergétique devenant excédentaire, la cinétique deviendrait linéaire.

Contrôle génique des autres réactions du métabolisme du galactose :

Il vient d'être montré que deux des gènes connus qui intéressent le métabolisme du galactose chez les levures contrôlent la présence de deux enzymes intervenant dans le métabolisme de ce sucre : la galactose-perméase et la galactokinase.

On ne connaît pas, à l'heure actuelle, de mutant de levure dépourvu de Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase ou d'UDPGal-4-épimérase.

Par contre, de tels mutants existent chez d'autres organismes :

1) *chez l'homme*. — KALCKAR et coll. (1956) ont montré que la galactosémie, maladie humaine héréditaire, est causée par l'absence de l'enzyme Gal-1-P G-1-P uridylyltransférase. Le déterminisme génétique de cette maladie est encore mal connu, mais les travaux de KIRKMAN et BYNUM (1959) concernant le dosage de l'enzyme chez les hétérozygotes, aussi bien que le pedigree des familles comprenant des galactosémiques, semblent indiquer que la mutation d'un seul gène est à l'origine de la maladie.

2) *chez E. coli*. — MORSE, LEDERBERG et LEDERBERG (1956) ont isolé une série de mutants de *E. coli* K₁₂, galactose-négatifs, se répartissant en deux différents « cistrons ». L'analyse enzymatique de ces mutants, effectuée par KURAHASHI (1957) a montré que l'un des cistrons concerne la galactokinase, tandis que l'autre concerne la Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase.

D'autres mutants, génétiquement plus complexes, isolés par LEDERBERG (1958) et analysés par KALCKAR et coll. (1959) sont déficients en UDPGal-4-épimérase, de même que des mutants obtenus indépendamment par FUKASAWA et NIKAIKO (1959).

5.5. RÉSUMÉ

1) Les souches étudiées qui portent l'allèle récessif g_1 ne synthétisent pas la galactokinase (mesurée par son activité après induction). Cependant, les autres enzymes du métabolisme du galactose sont induites dans ces conditions. On peut donc en conclure que le gène G_1 contrôle, spécifiquement, la biosynthèse de la galactokinase.

2) Les souches portant l'allèle G_2 concentrent le galactose après induction. Au contraire, la souche portant l'allèle g_2 conserve, même après induction, une perméabilité faible envers le galactose (du même ordre de grandeur que celle des cellules non-induites). On peut donc en conclure que le gène G_2 contrôle la biosynthèse induite d'un système de transport actif du galactose chez *S. cerevisiae*. Ce système a été assimilé à une « galactose-perméase ».

3) Quelques propriétés de la galactose-perméase ont été étudiées :

a) La vitesse de concentration du galactose radioactif, chez la souche de géno-

type $g_1G_2G_3$ varie avec la concentration extérieure du galactose. A 28° , elle passe de 1 μ mole à 300 μ moles par minute et par g de poids sec, pour des concentrations en galactose de 10^{-3} M et 10^{-1} M, respectivement.

b) La vitesse initiale (estimée par extrapolation) de pénétration du galactose est de 590 μ moles par minute et par g de poids sec, pour une concentration de galactose 10^{-1} M.

c) La vitesse maximum (extrapolée) est environ 1 μ mole par minute et par g de poids sec.

d) La concentration intracellulaire (apparente) atteinte après 10 minutes, varie avec la concentration extérieure : la souche de génotype $g_1G_2G_3$ concentre environ 7 à 8 fois lorsque la concentration extérieure varie entre 10^{-3} et 10^{-1} M.

e) La concentration intracellulaire maximum (déduite par extrapolation) est de l'ordre de 4 M. pour la souche de génotype $g_1G_2G_3$.

f) La vitesse de concentration varie avec la température. Son maximum se situe aux environs de 37° . Le Q_{10} de cette variation est situé entre 3 et 4 pour les souches induites de génotypes $g_1G_2G_3$ et $G_1g_2G_3$, et est de l'ordre de 0,5 pour toutes les souches non induites. Les Q_{10} obtenus montrent que :

— La réaction catalysée par la galactose-perméase est probablement de nature enzymatique.

— La perméabilité des cellules non-induites n'est probablement pas de nature enzymatique.

— Il est également probable que la faible activité présente dans la souche de génotype $G_1g_2G_3$ (de l'ordre de 15 p. 100 de l'activité galactose-perméasique) est de nature enzymatique.

g) Le glucose inhibe la pénétration du galactose. A concentrations équimoléculaires de glucose et de galactose, la perméabilité envers le galactose (mesurée par la vitesse d'entrée) est inhibée de 57 p. 100. Ce phénomène a été discuté comme l'une des interprétations possibles du phénomène d'attaque préférentielle.

h) Le produit concentré par la souche de génotype $g_1G_2G_3$, c'est-à-dire sous l'effet de la galactose-perméase seule, (en absence de tout métabolisme du galactose), présente des propriétés chromatographiques identiques à celles du galactose libre.

i) Le produit concentré par la souche CH-1, métabolisant le galactose semble par ses propriétés (R_f , absence de pouvoir réducteur, réaction positive au nitrate d'argent, libération après hydrolyse d'un seul sucre réducteur de même R_f que le glucose), pouvoir être identifié au tréhalose. Les rôles que l'on peut attribuer à l'incorporation des sucres libres dans le pool de tréhalose intracellulaire ont été discutés.

j) La souche de génotype $g_1G_2G_3$, induite, présente une perméabilité envers le galactose du même ordre de grandeur que la souche CH-1. Il semble donc exclu que le gène G_3 puisse être en rapport avec l'activité galactose-perméasique finale des souches de ce génotype, mais il reste possible que ce gène contrôle le mode d'induction de la galactose-perméase.

4) L'existence de gènes contrôlant la biosynthèse des autres enzymes du métabolisme du galactose (Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase, et UDPGal-4-épimérase) chez *E. coli* et chez l'homme a été brièvement mentionnée.

VI. - BIOSYNTHÈSE INDUITE DES ENZYMES DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE

Les recherches concernant le caractère inductible de la « galactozymase » seront résumées au cours de l'introduction et intégrées dans l'ensemble des connaissances acquises dans le domaine de l'adaptation enzymatique.

La galactozymase ayant été jusqu'à présent considérée comme un tout, il était intéressant d'étudier séparément la biosynthèse induite de chacune des enzymes impliquées.

Les expériences qui seront présentées au cours de ce chapitre permettent d'établir le caractère inductible de chacune de ces enzymes, d'étudier comparativement la cinétique et la spécificité de leur induction.

L'utilisation de souches mutantes permettra de montrer que le galactose se comporte comme un inducteur polyvalent provoquant la formation simultanée des enzymes du métabolisme du galactose.

Un certain nombre de paramètres influant sur l'adaptation au galactose seront étudiés. Il sera montré que l'addition d'une source d'énergie exogène, sous forme de petites quantités de glucose, permet de réduire la durée de la phase de latence et d'accélérer, dans certaines conditions, la vitesse de l'adaptation.

Mettant à profit l'exigence pour le tryptophane de la souche CH-1, il sera montré que la limitation en tryptophane exogène, au cours de l'adaptation, modifie de façon similaire les vitesses de biosynthèse des enzymes de deux systèmes inductibles différents : enzymes de la respiration terminale et enzymes du métabolisme du galactose.

De plus, la teneur en enzymes du métabolisme du galactose sera étudiée, en rapport avec le mode de culture et l'induction.

La signification de l'ensemble des résultats obtenus, concernant le mécanisme de l'induction et des régulations métaboliques internes (répressions), sera discutée.

6.1 INTRODUCTION.

Le phénomène de « l'adaptation enzymatique » a fait l'objet de très nombreux travaux. D'excellentes revues en ont dégagé les résultats essentiels et les hypothèses qui ont été successivement avancées pour expliquer ce phénomène ont été discutées d'une manière détaillée (*cf.* MONOD et COUX, 1952 ; POLLOCK, 1953 ; MONOD, 1955 et 1956 ; VOGEL, 1957 ; POLLOCK, 1959).

Les acquisitions les plus récentes ont permis d'apporter des bases solides à une théorie unifiée des mécanismes biochimiques et génétiques assurant le contrôle de la biosynthèse des protéines.

Bien que l'étude de la galactozymase ait été à l'origine des travaux concernant l'adaptation enzymatique, ce sont d'autres systèmes — β -galactosidase de *E. coli* (*cf.* MONOD, 1955), pénicillinase de *B. cereus* (*cf.* POLLOCK, 1959), et la formation des enzymes de la respiration terminale chez la levure (*cf.* SLONIMSKI, 1956) — qui ont fait l'objet des études les plus approfondies.

Au cours de cette introduction, je résumerai tout d'abord de façon succincte les principaux faits établis dans le domaine de l'adaptation enzymatique.

J'examinerai également l'état de nos connaissances en ce qui concerne la formation adaptative du système « galactozymase » chez la levure, système qui sera étudié plus en détail au cours de la partie expérimentale de ce chapitre.

Adaptation enzymatique. — Généralités.

Au sein d'une population de cellules d'un génotype défini, l'apparition d'une capacité enzymatique nouvelle peut être due à deux phénomènes essentiellement différents :

1) Toutes les cellules de la population sont génétiquement capables de former l'enzyme nouvelle, mais cette formation requiert la présence d'une substance spécifique, « l'inducteur ». Si nous prenons comme exemple une adaptation à l'utilisation d'un substrat, le génotype de la population demeurera inchangé, même après croissance aux dépens de ce métabolite. Ce phénomène est communément appelé « *adaptation enzymatique* ».

2) Toutes les cellules sont génétiquement incapables de former l'enzyme nouvelle, mais seule une mutation confère à certaines d'entre elles la capacité de la former et de se multiplier aux dépens du métabolite considéré. L'utilisation de ce dernier résultera donc de la sélection du génotype mutant.

a) Si la capacité de former l'enzyme peut s'exprimer en absence de l'inducteur, la croissance de la population sera le résultat de la superposition de deux phénomènes : *mutation*, suivie de *sélection*.

b) Si l'apparition de l'enzyme requiert la présence de l'inducteur, le phénomène de l'adaptation enzymatique s'ajoutera aux deux précédents. La croissance sera alors le résultat de : *mutation* — *adaptation enzymatique* — *sélection*.

Le phénomène d'adaptation enzymatique peut donc être défini par les critères suivants : nécessité de la présence d'un inducteur, absence de modification du génotype après adaptation.

On voit que le phénomène d'adaptation enzymatique conduit à classer les enzymes en deux catégories apparemment distinctes :

—a) *Les enzymes adaptatives*. — Elles apparaissent après addition d'une substance chimique définie et spécifique appelée « inducteur » ;

—b) *les enzymes constitutives*. — Leur présence ne dépend pas de l'action d'un inducteur exogène.

Cette distinction, basée sur les faits expérimentaux, conduit à formuler trois hypothèses :

—1) Les enzymes constitutives et les enzymes adaptatives sont deux catégories différentes de protéines, en ce qui concerne leur mode de biosynthèse ;

—2) toutes les enzymes sont de nature adaptative, mais certaines apparaissent constitutives à cause de la présence d'un inducteur endogène ;

—3) toutes les enzymes sont de nature constitutive, mais certaines apparaissent adaptatives, à cause de la présence d'une substance qui en inhibe l'activité ou la synthèse et dont l'effet est spécifiquement neutralisé par l'inducteur. Cette substance est appelée « répresseur ».

En ce qui concerne la première hypothèse, il a pu être montré que dans les deux cas où les enzymes ont pu être obtenues dans un état de pureté suffisant (β -galactosidase, COHN et TORRIANI, 1953, pénicillinase, POLLOCK, 1956), l'enzyme formée après induction et l'enzyme formée constitutivement par des mutants homologues,

sont identiques, par l'ensemble des propriétés chimiques, physiques et immunologiques étudiées.

Jusqu'en 1958, la seconde hypothèse était la plus couramment admise. Toutefois, l'existence d'un inducteur endogène n'a jamais pu être démontrée.

Une expérience de PARDEE, JACOB et MONOD (1958) devait faire passer au premier plan la troisième hypothèse. En effet, les résultats des croisements réciproques en absence d'inducteur, de deux souches de *E. coli* de génotype i^-z^- et i^-z ⁽¹⁾ ont conduit à admettre que la présence du gène i^- provoque l'accumulation d'une substance appelée « répresseur », capable d'antagoniser l'action du gène z . Les mutants constitutifs, portant l'allèle i (récessif) ne seraient donc plus des mutants contenant un inducteur endogène, mais des mutants ayant perdu la capacité de former un répresseur actif.

De nombreux systèmes enzymatiques répondent à ce schéma (cf. MAGASANIK, et coll. 1959, pour revue).

Il a été montré depuis longtemps que l'une des caractéristiques principales de l'induction réside dans la spécificité de l'inducteur. Toutefois, la propriété d'être un inducteur n'est pas liée à la capacité d'être un substrat de l'enzyme induite (MONOD et coll., 1951 ; voir aussi MONOD, 1955).

Un inducteur exogène des enzymes d'une chaîne de biosynthèse est, soit le premier substrat de cette chaîne, soit une substance possédant une analogie structurale étroite avec le substrat. Un répresseur exogène est apparemment le produit final d'une chaîne de biosynthèse. Certains analogues structuraux peuvent également en reproduire les effets (COHEN et JACOB, 1959). Toutefois, la nature du répresseur endogène, probablement plus complexe, n'a pas encore été déterminée.

Le rôle de l'inducteur semble être d'ordre catalytique, puisque, dans le cas de la pénicilline, POLLOCK a pu montrer qu'une cellule de *B. cereus* peut former 30 à 40 molécules de pénicillinase par heure et par molécule de pénicilline fixée (cf. POLLOCK et PERRET, 1951).

Il ressort de ce qui précède que par le jeu de substances spécifiques, inducteurs et répresseurs, l'activité métabolique d'une cellule peut être modifiée, en réponse à des variations du milieu intérieur ou du milieu extérieur. Un tel contrôle, peut à priori, s'exercer de plusieurs façons :

- A) Transformation d'un précurseur de l'enzyme.
- B) Remaniement d'une structure protéique préexistante.
- C) Levée d'une répression ou induction de la synthèse d'une protéine spécifique.

Mécanisme A :

L'hypothèse de YUDKIN (1938) attribuait à l'inducteur-substrat le rôle d'un complexant de l'enzyme, accélérant la transformation d'un précurseur protéique inactif en enzyme active par le déplacement de la réaction d'équilibre :



(1) On connaissait depuis longtemps l'existence, chez *E. coli*, de mutants constitutifs pour la β -galactosidase (LEDERBERG, 1951). L'étude génétique de ces mutants a montré que le caractère Inductibilité/Constitutivité, est placé sous le contrôle d'un couple d'allèles i^+/i^- , tandis que la capacité de former l'enzyme est placée sous le contrôle d'un gène distinct z^+-z^- (COHEN-BAZIRE et JOLIT, 1953 ; voir aussi PARDEE, JACOB et MONOD, 1959).

Mécanisme B :

La présence de l'inducteur peut avoir pour effet de provoquer une modification de structure d'une protéine préexistante. Tel semble être le cas de la lactico-déshydrogénase de la levure. En effet, la présence de plusieurs analogues d'acides aminés n'inhibe pas l'apparition, en aérobose, de l'enzyme à spécificité L-lactique, dans des conditions où la formation de plusieurs autres enzymes respiratoires est inhibée (cf. mécanisme C), et cette apparition est compensée par une diminution corrélative de l'enzyme anaérobie à spécificité D-lactique (KATTERMAN et SLONIMSKI, 1960). Des études physico-chimiques ont montré que les propriétés du site actif des deux enzymes sont différentes (cf. SLONIMSKI et TYSAROWSKI, 1958).

Mécanisme C.

L'absence d'un seul acide aminé (MONOD et coll., 1952), ou son remplacement par un analogue structural (HALVORSON et SPIEGELMAN, 1952) permettent de bloquer la biosynthèse des enzymes étudiées, β -galactosidase et maltozymase. De plus, les expériences isotopiques ont montré que, dans des conditions déterminées, la β -galactosidase est synthétisée à partir des acides aminés présents pendant l'induction, sans aucune participation des molécules plus complexes présentes dans la cellule au début de l'induction (COHN et MONOD, 1953 ; HOGNESS et coll., 1955). Il a été conclu de ces expériences que l'inducteur a pour effet de permettre la biosynthèse *de novo* d'une enzyme dont la formation était préalablement empêchée.

On pourrait penser que la non-formation de l'enzyme, en absence d'inducteur, était due à la présence d'un « répresseur » spécifique. Une telle explication est corroborée par l'ensemble des observations plus récentes qui ont montré que : 1) la présence de concentrations élevées de produits terminaux (arginine, tryptophane, par exemple) inhibe la synthèse des enzymes conduisant à leur formation ; 2) certaines enzymes, dites constitutives, sont synthétisées en quantités très supérieures à la normale lorsque la concentration endogène du produit de la réaction se trouve abaissée. Ce phénomène est appelé « dé-répression » (GORINI et MASS, 1957 ; voir aussi MAGASANIK et coll. 1959, et COHEN et JACOB, 1959).

Il est possible que ce phénomène de *répression enzymatique* puisse s'appliquer à l'ensemble de l'équipement enzymatique cellulaire.

Ces trois mécanismes s'accordent avec la définition de l'adaptation enzymatique telle qu'elle a été formulée au début de cette introduction : apparition d'une activité enzymatique nouvelle, sous l'influence d'un inducteur spécifique. Toutefois, seul un mécanisme de type C s'accompagne d'une synthèse *de novo* de l'enzyme : *Bio-synthèse induite*.

Ce dernier terme ne pourra être employé que lorsqu'il aura été montré que l'apparition de l'activité enzymatique nouvelle satisfait aux critères suivants : 1) présence d'une source d'énergie métabolisable, nécessaire à toute synthèse protéique ; 2) présence de tous les acides aminés indispensables.

Le fait que des protéines spécifiques sont synthétisées *de novo*, à partir des acides aminés, a conduit à imaginer un mécanisme permettant d'assurer, en une seule étape, l'arrangement structural spécifique des acides aminés de chaque espèce protéique. De nombreux schémas ont été proposés, reposant tous sur l'existence hypothétique d'un « template » ou « matrice », médiateur de l'information génique :

La découverte récente de l'existence de « gènes opérateurs », contrôlant, en combinaison avec le système de répression, l'activité des « gènes structuraux », directement responsables de la synthèse des protéines (JACOB et MONOD, 1959), permettra sans doute d'apporter des données nouvelles concernant les mécanismes qui président à la biosynthèse des protéines spécifiques.

Formation adaptative de la « galactozymase » chez la levure.

1) *Adaptation enzymatique.* — La première observation concernant la nécessité d'une adaptation préalable au galactose, pour que les levures puissent utiliser ce sucre, a été faite par DIENERT en 1900. Dès 1910 HARDEN et NORRIS montrèrent que la « galactozymase » (alors considérée comme une seule enzyme dont le rôle était d'assurer la fermentation du galactose) ne pouvait être mise en évidence que chez les levures préalablement « adaptées » au galactose. EULER et JANSSON (1927) excluaient la possibilité que la modification enzymatique soit due à une modification de la partie coenzymatique et rendaient donc probable l'interprétation selon laquelle la formation de l'apoenzyme était la cause de l'adaptation des levures à l'utilisation du galactose.

Au cours de ces expériences, la période de contact avec le galactose (jours et mêmes semaines), ou les milieux employés, ne permettaient pas d'éliminer la sélection, en tant qu'interprétation possible du phénomène d'adaptation au galactose.

C'est à STEPHENSON et YUDKIN (1936) que revient le mérite d'avoir montré que l'adaptation des levures au galactose est possible dans des conditions où le nombre des cellules vivantes n'augmente pas. De plus, ces auteurs confirmèrent les observations de DIENERT concernant la « désadaptation », c'est-à-dire la disparition progressive de la galactozymase, lorsque les cellules adaptées sont remises à proliférer sur un milieu contenant du glucose comme seule source de carbone. Les levures ainsi désadaptées sont capables de s'adapter à nouveau, en présence de galactose. L'adaptation des levures au galactose est donc accomplie sans modification des propriétés initiales de la population, répondant ainsi aux critères d'une « adaptation enzymatique ».

2) *Biosynthèse induite.* — L'hypothèse que formulait YUDKIN (1938) reposait sur le déplacement par le substrat d'une réaction d'équilibre entre un précurseur protéique et l'enzyme active. Toutefois, les expériences précédemment mentionnées ne permettaient pas de distinguer entre cette hypothèse et l'hypothèse d'une synthèse complète, *de novo* de l'enzyme.

a) *Nécessité d'une source d'énergie métabolisable.* — STEPHENSON et YUDKIN, (1936), SPIEGELMAN (1945) avaient montré que la formation induite de la galactozymase chez la levure peut avoir lieu, en aérobose, sans apport d'énergie exogène. Il est toutefois bien connu que les levures possèdent d'importantes réserves endogènes, utilisables en aérobose, mais non-fermentescibles (*cf.* TREVELYAN, 1958, pour revue).

Si l'adaptation au galactose est le résultat d'une biosynthèse induite de tout ou partie de la galactozymase, on doit donc s'attendre à ce que l'adaptation en anaérobiose dépende de l'addition d'une source d'énergie exogène (1).

(1) *E. coli* qui ne possède pas de réserves hydrocarbonées importantes, requiert, en présence d'un inducteur non métabolisable, une source exogène d'énergie pour former la β -galactosidase (MONOD et COHN, 1952). SLOMINSKI (1956) a étudié quantitativement l'énergétique de la formation adaptative des enzymes respiratoires chez la levure et a pu montrer que la vitesse d'adaptation est, dans les conditions choisies, directement proportionnelle au débit énergétique.

Les résultats de REINER et SPIEGELMAN (1947), montrant une formation induite de la galactozymase, en anaérobiose, sans autre apport carboné que le galactose utilisé comme inducteur, étaient donc en contradiction apparente avec cette hypothèse. Cependant, LINDENGREN et PALLERONI (1952) montrèrent que ces résultats étaient dûs à la présence de glucose dans le galactose utilisé par ces auteurs. Après une purification plus poussée de ce sucre, la plupart des souches essayées se sont révélées incapables de s'adapter anaérobiquement, dans les conditions précédemment utilisées. Toutefois, si l'adaptation au galactose est amorcée en aérobiose, c'est-à-dire en présence d'un métabolisme énergétique endogène, celle-ci peut ensuite se poursuivre en anaérobiose, la galactozymase déjà formée étant alors capable de fournir l'énergie nécessaire (SPIEGELMAN, 1945).

On peut donc admettre que, d'une manière générale, la formation adaptative de la galactozymase, chez la levure, requiert la participation d'une source d'énergie métabolisable, endogène, ou à défaut, exogène.

b) *Nécessité d'une source d'azote assimilable.* — Il a déjà été signalé que la formation de la galactozymase, chez la levure, peut avoir lieu en absence d'une source d'azote exogène (STEPHENSON et YUDKIN, 1936). Au contraire, la biosynthèse de la β -galactosidase, chez *E. coli*, requiert, soit la présence d'une source d'azote exogène (MONOD et COHN, 1952), soit la présence d'un « turn-over » protéique (MANDELSTAM, 1957). Si des mutants auxotrophes sont utilisés, l'acide aminé indispensable à la croissance est également indispensable à la formation de la β -galactosidase (MONOD et coll., 1952).

Puisque la levure possède un pool important d'acides aminés, alors que celui de *E. coli* est comparativement très restreint (TAYLOR, 1947), on pouvait penser que la biosynthèse des enzymes inductibles pouvait s'effectuer chez la levure, à partir des acides aminés du pool. La participation de ce pool à la formation adaptative de la maltozymase, chez la levure, fut mise en évidence par HALVORSON et SPIEGELMAN (1952), grâce à l'utilisation d'analogues des acides aminés. Ces expériences n'avaient toutefois pas été répétées en ce qui concerne la formation adaptative de la galactozymase.

Il a pu être montré depuis, que l'absence d'un acide aminé essentiel à la croissance d'un mutant auxotrophe de *S. cerevisiae* réduit considérablement la vitesse d'adaptation au galactose, et que celle-ci augmente en fonction de la concentration exogène de cet acide aminé (de ROBICHON-SZULMAJSTER et SOMLO, 1959) ⁽¹⁾.

Il semble donc que ces résultats, nécessité d'une source d'énergie métabolisable et nécessité d'une source d'azote assimilable, permettent de considérer la formation adaptative de la galactozymase, chez la levure, comme une « biosynthèse induite » (cf. b.1).

Au cours des travaux concernant l'adaptation des levures au galactose, mentionnés jusqu'ici, la galactozymase avait toujours été considérée comme un tout. Seuls les travaux biochimiques récents qui ont été exposés au cours des précédents chapitres, ont permis de connaître la nature complexe de ce système enzymatique, et ont rendu possible, le dosage spécifique de chacune des enzymes impliquées.

Il a donc semblé intéressant d'aborder l'étude de l'adaptation des levures au galactose au niveau enzymatique, et d'essayer de définir, de façon plus précise, les caractéristiques essentielles de ce système inductible.

(1) Ces expériences seront exposées en détail au cours de la partie expérimentale de ce chapitre.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

6.2 MISE EN ÉVIDENCE DU CARACTÈRE ADAPTATIF
DES ENZYMES DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE :
COMPARAISON ENTRE *S. CEREVISIAE* ET *S. FRAGILIS*.

Le caractère inductible des enzymes du métabolisme du galactose chez *S. cerevisiae* ressort des résultats qui ont été présentés au cours des chapitres précédents. On a vu, en effet, que la galactose-perméase, la galactokinase, la Gal-1-P/

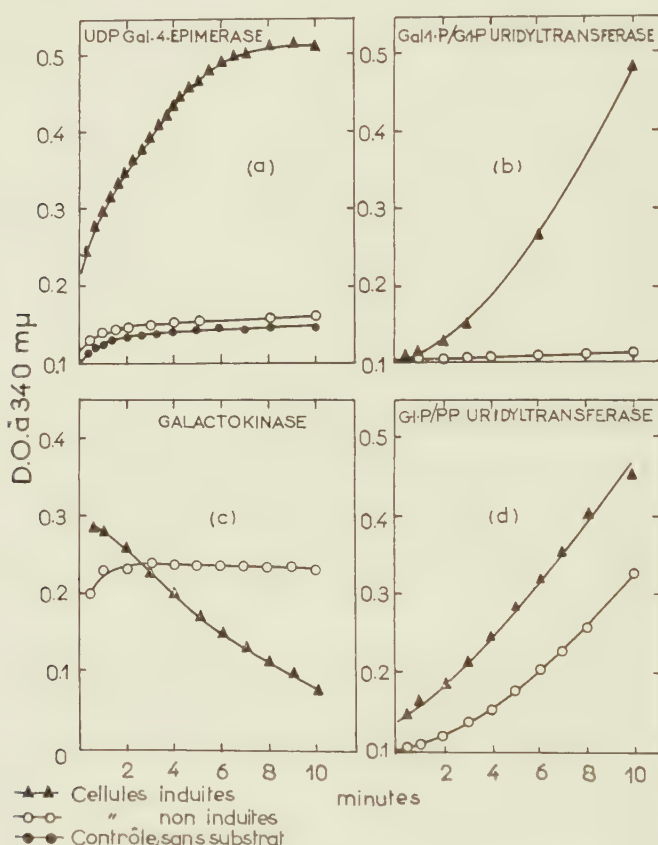


FIG. 36. — Dosage des enzymes du métabolisme du galactose chez *Saccharomyces fragilis*, induit et non-induit.

Les conditions expérimentales sont décrites dans le texte.

G-1-P uridyltransférase et l'UDPGal-4-épipérase, sont absentes des cellules non-induites, tandis que les cellules ayant effectué leur croissance en présence de galactose possèdent ces quatre enzymes (sauf dans le cas où le gène responsable de leur biosynthèse est présent sous la forme de l'allèle récessif).

Par ailleurs, MILLS, SMITH et LOCHHEAD (1957) trouvèrent une activité UDPGal-4-épipérase dans des broyats de *S. fragilis* (National Collection of Yeast Cul-

ture N°100) effectués après culture en absence de galactose, d'où ils conclurent au caractère constitutif de cette enzyme chez la levure.

C'est pourquoi j'ai effectué certaines expériences à l'aide d'une souche de *S. fragilis* (provenant de l' « American Type Culture Collection »). La figure 36 donne un exemple des cinétiques obtenues pour le dosage des différentes enzymes dans les cellules adaptées ou non-adaptées. On voit que les trois enzymes métabolisant le galactose, y compris l'UDPGal-4-épimérase (1, 2, et 3 de la figure 36), ne sont présentes que dans les extraits de cellules induites. Au contraire, la G-1-P/PP uridy1-transférase est, de même que chez *S. cerevisiae*, présente dans les cellules non-induites, aussi bien que dans les cellules induites (de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1958a).

Cette souche de *S. fragilis* se comporte donc d'une façon tout à fait comparable à *S. cerevisiae*. Le désaccord entre ces résultats et ceux des précédents auteurs n'a pu être expliqué.

6.3 ÉTUDE DE L'INDUCTION DES ENZYMES DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE

A) Concentrations inductrices

Au cours d'une série d'expériences j'ai cherché à définir quelles sont, pour les souches 1235/2b (génotype $g_1G_2G_3$) et 1238/5d (génotype $G_1g_2G_3$), les concentrations de galactose capables d'induire les différentes enzymes assurant son métabolisme. La souche de génotype $g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$ galactose-positive, n'a pas été étudiée ici en raison de sa capacité d'utiliser le galactose après induction. En effet, une concentration constante en galactose ne pourrait être maintenue qu'à l'aide d'un « cheostat ».

TABLEAU 16

Incorporation du ^{14}C -galactose dans la fraction nucléotidique

10.³ µmoles de galactose incorporé par mg de protéine et par heure.

Moyenne de deux expériences.

Après croissance sur milieu naturel 3S-glucose, incubation en présence de galactose (selon les concentrations indiquées) ; tampon phosphate, pH 6,5, 0,1 M et tryptophane 10µg/ml, p pendant 8 heures, 28°, agitation.

Les cellules sont ensuite centrifugées, lavées, et les extraits effectués selon la méthode habituelle (cf. 3.7).

Incubation : 60 minutes à 37°, en présence de :

— Galactose $^{14}C + ^{14}C$: 1 µmole

— ATP : 1,7 µmoles ; $MgCl_2$: 5 µmoles ; UDPG : 0,5 µmoles ; FNa : 25 µmoles ; cystéine neutralisée : environ 30 µmoles.

— Tampon Tris, pH 7,0, concentration finale 0,1M.

— Enzymes (ajoutées comme indiqué) : quantité équivalente à 1 mg de protéine des préparations purifiées.

— Eau distillée : complément à 1 ml.

Dosages effectués selon la technique habituelle (voir 3.10).

Galactose (mg/ml) pendant l'adaptation	Extraits seuls		Extraits + Gal-1-P/G-1-P uridy1transférase		Extraits + Galactokinase	
	$g_1G_2G_3$	$G_1g_2G_3$	$g_1G_2G_3$	$G_1g_2G_3$	$g_1G_2G_3$	$G_1g_2G_3$
0	0	0	0	0	0	0
0,1	—	0,2	—	0	—	0
1,0	0	6	0	8	8,5	33,5
10	0	12,5	0	11,0	90,0	40,0

Quatre concentrations initiales de galactose ont été essayées : 0,01, 0,1, 1 et 10 mg/ml, pour une période unique d'incubation arbitrairement fixée à 8 heures.

Le tableau 16 résume les résultats obtenus en mesurant l'incorporation du ^{14}C -galactose dans les nucléotides uridyliques. Rappelons qu'une incorporation n'est possible qu'à la condition que les deux enzymes, galactokinase et Gal-1-P/G-1-Puridyl-transférase, soient présentes.

On voit, comme cela a déjà été montré au cours du chapitre précédent, qu'il n'y a incorporation, pour les extraits de la souche galactokinase-négative (génotype $g_1G_2G_3$) que lorsqu'on ajoute la galactokinase au mélange d'incubation. L'induction est nettement positive (au moins 50 p. 100 de la valeur maximum) pour la concentration de 1 mg/ml.

Les résultats reproduits dans le tableau 17 donnent les activités des trois enzymes mesurées séparément, après induction dans des conditions peu différentes des conditions précédentes (voir légende du tableau 16.)

TABLEAU 17

*Induction des enzymes du métabolisme du galactose,
en présence de quantités variables de galactose*

10^{-4} μ moles de substrat transformé par minute et par mg de protéine, rapporté à 1000 U. de G-1-P/PP uridyl-transférase.

Culture sur milieu synthétique H_3T -glucosé, le glucose étant le facteur limitant. Lorsque la croissance s'arrête, on ajoute le galactose aux concentrations indiquées et on laisse incuber 8 heures, à 28°, avec agitation. Les levures sont ensuite centrifugées, lavées, et les extraits et dosages d'enzymes effectués de la manière habituelle (voir 3.10).

Galactose (mg/ml) pendant l'adaptation	Galactokinase		Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase		UDP Gal-4- épimérase	
	$g_1G_2G_3$	$G_1g_2G_3$	$g_1G_2G_3$	$G_1g_2G_3$	$g_1G_2G_3$	$G_1g_2G_3$
0.....	0,01	0,03	0	0	0	0
0,01.....	0	—	0	—	0	—
0,1.....	0	2,7	37,7	14,5	16,8	3,0
1,0.....	0	57,7	710	649	92,5	89,0
10.....	0,02	55,1	780	554	—	49,8

On voit que la limite inférieure de l'induction est située entre 0,01 et 0,1 mg/ml, et se trouve être la même pour chacune des trois enzymes, dans les deux souches.

Lorsque l'incubation est faite en présence d'acétate procurant une source d'énergie additionnelle, on constate (tableau 18) que la concentration minimum ayant permis un début d'induction est alors 0,01 mg/ml pour la souche de génotype $g_1G_2G_3$. Toutefois, cette concentration est inefficace pour la souche de génotype $G_1g_2G_3$ qui, de même que dans les expériences précédentes, ne commence à être induite que pour la concentration 0,1 mg/ml.

Ces résultats correspondent à ce à quoi on aurait pu s'attendre étant donné le génotype des souches. En effet, la souche 1235/2b, possédant une galactose-perméase, est capable de concentrer environ 10 fois le galactose à partir du milieu extérieur (voir 5.3). La concentration intracellulaire requise pour induire les trois enzymes du

TABLEAU 18

*Induction des enzymes du métabolisme du galactose en présence d'acétate
et de quantités variables de galactose*

10.⁴ μ moles de substrat transformé par minute et par mg de protéine, rapporté à 1000 U. de G-1-P/PP uridylyltransférase.

Adaptation en présence d'acétate (0,1M, pH 6,0), de galactose (selon les concentrations indiquées) et de tryptophane (10 μ g/ml), pour une durée de 8 heures, à 28°, avec agitation. Extraits et dosages ont été effectués selon les techniques habituelles (voir 3.10).

Galactose (mg/ml) pendant l'adaptation	Galactokinase		Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase		UDPGal-4- épipimérase	
	G ₁ G ₂ G ₃	G ₁ G ₂ G ₃	G ₁ G ₂ G ₃	G ₁ G ₂ G ₃	G ₁ G ₂ G ₃	G ₁ G ₂ G ₃
0.....	0	0	0,1	0,4	0	0
0,01.....	0	0	46	0	31	0
0,1.....	0	32	144	91	89	27
1,0.....	0	113	716	417	196	170
10.....	0	129	986	384	237	164

métabolisme du galactose est donc celle qui est suffisante pour la souche 1238/5d qui ne concentre pas, c'est-à-dire 0,1 mg/ml ou 5×10^{-4} M.

Il est évident que cette valeur ne représente qu'un ordre de grandeur, valable seulement pour les conditions expérimentales employées.

B) Spécificité de l'inducteur

Une série de sucres, présentant des analogies de structure avec le D-galactose, ont été essayés : L-galactose, D-arabinose, L-arabinose, L-fucose, D-lyxose, D-lactose, 2-désoxygalactose et le thiométhyl-galactoside (TMG). Dans les conditions expérimentales choisies (concentration 10 mg/ml, incubation de 8 heures dans du tampon phosphate 0,1 M, pH 6,5), tous ces composés ont donné des résultats négatifs pour les trois enzymes métaboliques. L'induction de la galactose-perméase n'a pas été recherchée au cours de ces expériences.

Le D-galactose semble donc être, jusqu'à présent, le seul composé capable d'induire la formation des enzymes assurant son métabolisme ⁽¹⁾.

6. 4 ÉTUDE DE LA PÉRIODE DE LATENCE PRÉCÉDANT L'ADAPTATION AU GALACTOSE

Comme le montre la figure 37, l'adaptation des levures au galactose peut être suivie, dans l'appareil de Warburg, par l'évolution de la capacité respiratoire vis-à-vis de ce sucre. L'adaptation aérobie des levures au galactose comporte trois phases : une période de latence, une période d'accroissement linéaire de la capacité d'oxyder le galactose, et un plateau.

On voit que la respiration endogène, relativement élevée au début ($QO_2 = 25$),

(1) Les substrats intermédiaires, galactose-1-phosphate et UDPGalactose, n'ont pas été essayés, puisqu'il semble très improbable, par analogie avec les faits connus concernant les esters phosphorylés du glucose, que ces produits puissent franchir la membrane cellulaire.

baisse rapidement pour atteindre, après la troisième heure une valeur constante ($QO_2 = 10$).

D'autre part, la respiration mesurée dans la cupule contenant du galactose est supérieure à la respiration endogène pendant les deux premières heures. Ceci est dû aux traces de glucose encore présentes dans le galactose employé, même après purification (voir 3.2). En se basant sur le dégagement de CO_2 obtenu en aérobiose avec des levures non-adaptées, cette impureté peut être estimée à $0,7 \mu\text{mole}$ par cupule (pour 20 mg de galactose), c'est-à-dire à $0,35 \mu\text{mole/ml}$ (cf. 3.2).

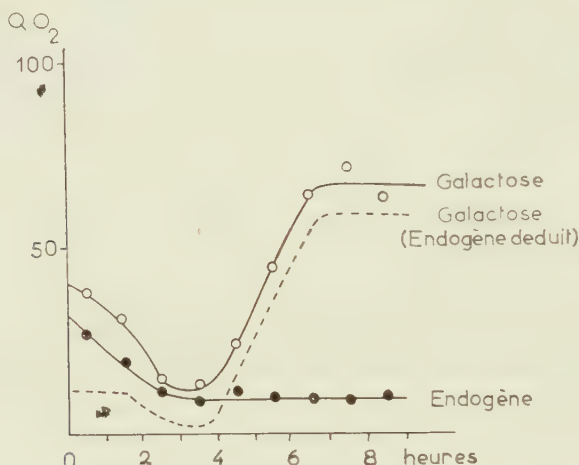


FIG. 37. — Cinétique de l'adaptation à la respiration en présence de galactose.
Saccharomyces cerevisiae : souche CH-1.

Tampon phosphate pH 6,0 0,1M ; galactose purifié à la concentration finale de 2 p. 100 ; cellules lavées 1,5 mg par cupule ; L-tryptophane à la concentration finale de $10 \mu\text{g/ml}$; 0,3 ml de KOH à 20 p. 100 dans le compartiment central ; volume total 2,3 ml.

Sauf mention spéciale, toutes les expériences d'adaptation utilisant la souche CH-1 ont été effectuées en présence de tryptophane à la concentration de $10 \mu\text{g/ml}$. En effet, il a déjà été indiqué que cette souche requiert le tryptophane pour sa croissance, et il sera montré plus loin qu'elle requiert aussi cet acide aminé pour former adaptativement les enzymes de la respiration terminale et les enzymes du métabolisme du galactose. Afin de rendre les courbes plus comparables d'une expérience à l'autre, les valeurs de la respiration endogène ont été déduites des valeurs obtenues en présence de galactose.

A) Durée de la période de latence.

La période de latence est de durée variable. Elle peut exceptionnellement être nulle, toutefois, elle se prolonge, le plus fréquemment entre deux et cinq heures.

L'examen des figures 40, 41 et 42 (voir plus loin), montre que cette période de latence est commune à toutes les enzymes du système, mais il est difficile de définir avec précision le moment où chacune de ces enzymes commence effectivement à être formée. Si l'on se reporte aux résultats de la figure 41 (souche CH-1), on peut voir

que, après 6 heures d'incubation, l'adaptation est nettement commencée, pour chacune des trois enzymes testées.

B) *Influence d'une source additionnelle d'énergie sur la durée du temps de latence.*

On sait que l'adaptation respiratoire sur glucose (induction par l'oxygène des enzymes de la respiration terminale) est précédée d'une phase de latence (SLONIMSKI, 1950). On vient de voir qu'il en est de même pour l'adaptation au galactose. Toutefois, cette phase de latence est toujours plus courte pour le premier système que pour le second. On peut se demander si cette différence n'est pas due au fait que le glucose continue à être fermenté au cours de l'adaptation respiratoire, procurant ainsi une source énergétique importante qui facilite le démarrage du processus d'adaptation.

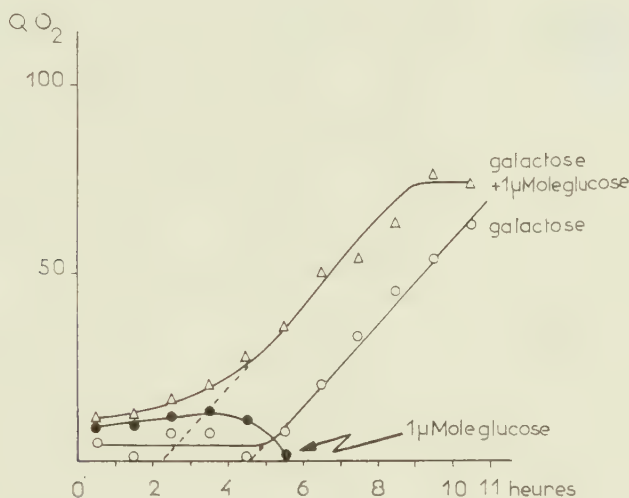


FIG. 38. — Adaptation au galactose de levures cultivées en aérobiose sur glucose ; influence de l'addition d'une petite quantité de glucose.

S. cerevisiae CH-1.

Respiration endogène déduite.

Conditions identiques à celles de la figure 37

Au contraire, le galactose ne peut être utilisé, que ce soit aérobiquement ou anaérobiquement, qu'après induction des enzymes assurant son métabolisme, comme cela a été démontré par l'ensemble des expériences exposées jusqu'à maintenant. Les cellules aérobies ne disposent donc, pour former les enzymes du métabolisme du galactose, que de l'apport énergétique de la respiration endogène. C'est pourquoi il a semblé intéressant de chercher quel pourrait être l'effet d'une source additionnelle d'énergie sur le début de l'adaptation au galactose.

Etant donné l'effet bien connu du glucose (MONOD, 1942) en tant qu'inhibiteur de l'adaptation enzymatique, il était exclu d'essayer l'effet de ce sucre à fortes concentrations. Toutefois, SLONIMSKI (1956) a montré que l'addition de petites quantités de glucose permettait d'obtenir une adaptation rapide des levures à la respiration de l'éthanol.

Comme le montre la figure 38, l'addition à des levures aérobies d'une quantité

de glucose aussi petite que $1 \mu\text{mole}$ par ml et par 0,5 mg P. sec de cellules, permet déjà de raccourcir considérablement le temps de latence qui précède l'adaptation à l'utilisation du galactose. On voit que, dans cette expérience particulière, le temps de latence est passé de 4,5 h à 2 h. De plus, cette quantité de glucose est complètement consommée bien avant que l'adaptation au galactose soit terminée.

La réduction du temps de latence est d'autant plus grande que la quantité de glucose apportée est plus élevée (entre 1 et 6 μmoles), comme le montre la figure 39.

Il semble donc que l'un des facteurs déterminant la durée de la phase de latence soit la quantité d'énergie nécessaire pour les synthèses.

Cependant, d'autres observations montrent que le contrôle de la durée du temps de latence n'est probablement pas exclusivement d'ordre énergétique.

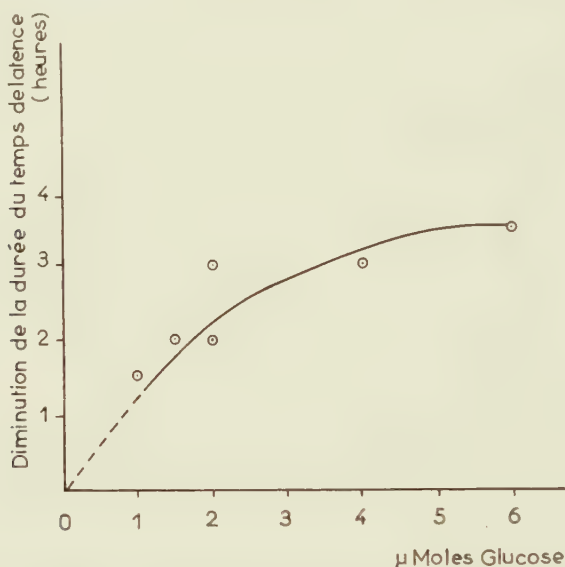


FIG. 39. — Effet de petites quantités de glucose sur la durée du temps de latence précédant l'adaptation aérobie au galactose.
S. cerevisiae, souche CH-1.

a) D'autres composés énergétiques, tels que le glycérol, le lactate et l'acétate, essayés à des concentrations variant entre 2 et 6 p. 100, se sont montrés tantôt sans action, tantôt inhibiteurs, bien qu'ils aient permis de maintenir pendant plusieurs heures des QO_2 de 30 à 40 (1).

b) Si l'on prolonge jusqu'à l'axe des abscisses la partie des courbes correspondant à l'adaptation au galactose proprement dite, au cours de l'adaptation double (voir plus loin, figure 44), on voit que, si la durée de la phase de latence a été également diminuée, elle reste, même dans ces conditions, probablement supérieure à celle qui précède la formation induite des enzymes respiratoires.

(1) Les résultats qui ont été résumés dans le tableau 17 indiquent que l'acétate a permis, au cours de ces expériences, une meilleure adaptation au galactose (diminution, pour une souche, de la concentration capable d'induire). La cinétique de l'adaptation n'ayant pas été suivie au cours de ces expériences, il est impossible de dire quel paramètre de l'adaptation a été modifié par la présence de l'acétate.

c) Selon les conditions physiologiques des cellules (milieu de culture employé, moment de la croissance auquel est effectué le prélèvement, etc.) la respiration endogène varie considérablement : QO_2 de 0 à environ 40. Cependant, malgré le grand nombre d'expériences effectuées dans ce domaine, il ne semble pas possible d'établir une corrélation entre la durée du temps de latence et la présence des réserves endogènes respirables.

6.5 ÉTUDE CINÉTIQUE DE L'ADAPTATION ET DE QUELQUES FACTEURS CAPABLES DE LA MODIFIER.

A) Cinétique d'induction de chaque enzyme.

Galactose-perméase.

Il a déjà été signalé, dans le chapitre précédent, que la galactose-perméase, de même que les autres enzymes du métabolisme du galactose, est de nature adaptative. La cinétique de son induction a été suivie chez la souche de génotype $g_1G_2G_3$, et également chez la souche CH-1. Chez cette dernière souche, l'induction des autres enzymes entraîne, rappelons-le, l'accumulation d'une substance de réserve qui n'est pas du galactose libre, mais probablement du tréhalose.

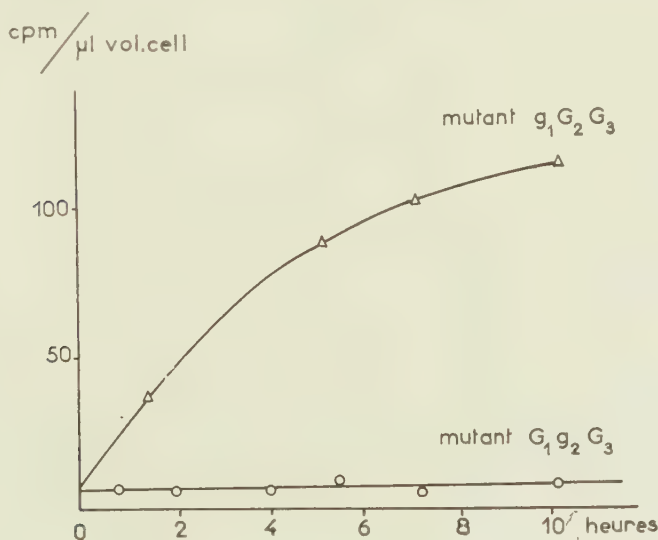


FIG. 40. — Variation de la capacité de concentrer le ^{14}C galactose en fonction de la durée du contact préalable des cellules avec le galactose non-radioactif. Souche galactokinase-négative ($g_1G_2G_3$) et galactose perméase-négative ($G_1g_2G_3$).

Pour l'induction, une seule concentration de galactose a été choisie, suffisante pour induire toutes les souches : 10 mg/ml. Au cours de l'incubation avec le galactose, des échantillons ont été prélevés, lavés avec soin, puis mis en contact avec du galactose radioactif selon la technique habituelle (voir 3.10).

Les résultats d'une expérience type sont représentés dans la figure 40. On voit que la perméabilité de la souche de génotype $G_1g_2G_3$ n'augmente pas au cours

du temps, et qu'elle demeure très faible (voir aussi 5.3). Au contraire, celle du mutant de génotype $g_1G_2G_3$ augmente rapidement pendant les premières heures de l'incubation, puis se stabilise. La perméabilité du diploïde augmente, pendant les premières heures, parallèlement à celle de la souche de génotype $g_1G_2G_3$, mais s'accélère ensuite, donnant à l'ensemble du phénomène l'aspect d'une courbe en S. Dans les deux cas, le plateau de l'induction se trouve atteint après 8 à 10 heures.

Dans l'expérience particulière, représentée dans la figure 40, il ne semble pas y avoir eu de temps de latence précédant l'induction. Toutefois, comme cela sera montré plus loin, il y a plus fréquemment une période de latence dont la durée est variable.

Enzymes du métabolisme du galactose.

1) *Induction chez la souche CH-1.* — Le dosage spécifique de la galactokinase se prête difficilement à une analyse en série. Aussi, seules les activités de la Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase et de l'UDPGal-4-épipimérase ont-elles été suivies comparativement à la galactose-perméase.

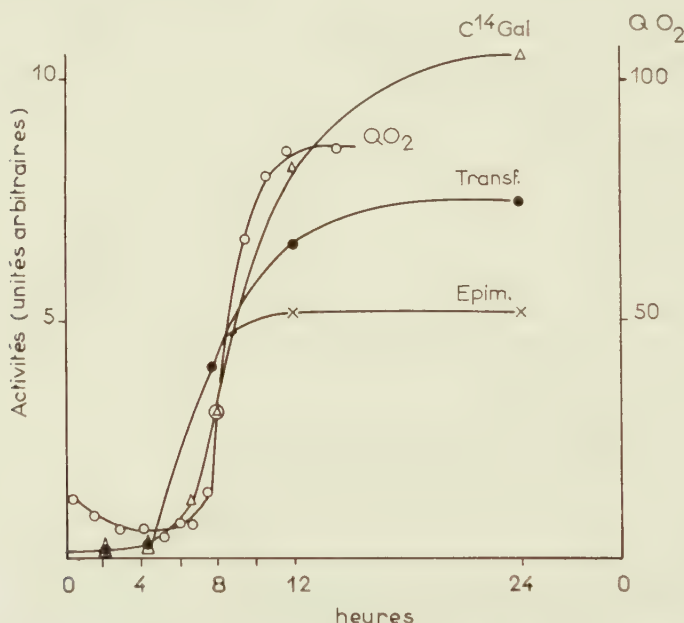


FIG. 41. — Induction des enzymes du métabolisme du galactose chez *S. cerevisiae* (génotype $g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$).
Les conditions expérimentales sont décrites dans le texte.

La figure 41 résume l'une de ces expériences, effectuée à l'aide de la souche CH-1. On voit que les cinétiques (exprimées en unités arbitraires), ne sont pas très différentes. Malgré l'imprécision inhérente à ce genre d'analyse discontinue, il semble que le début de l'adaptation se situe au même moment pour ces trois enzymes. En tous cas, l'induction de la perméase ne semble pas précéder celle des enzymes métaboliques.

2) *Induction chez le mutant galactokinase-négatif.* — Selon le schéma désormais classique de STANIER (1947), l'induction d'une chaîne métabolique d'enzymes serait un phénomène séquentiel, le premier substrat induisant la première enzyme de cette chaîne ; le fonctionnement de celle-ci conduisant à la formation du substrat de la seconde, d'où l'induction de cette dernière, etc...

On aurait donc dû s'attendre, dans le cas du mutant galactokinase-négatif, à ne pas trouver les enzymes situées au-delà du bloc génétique, même après incubation avec le galactose.

La figure 42 représente les résultats d'une expérience effectuée à l'aide du mutant de génotype $g_1G_2G_3$, dans les mêmes conditions que pour la souche CH-1.

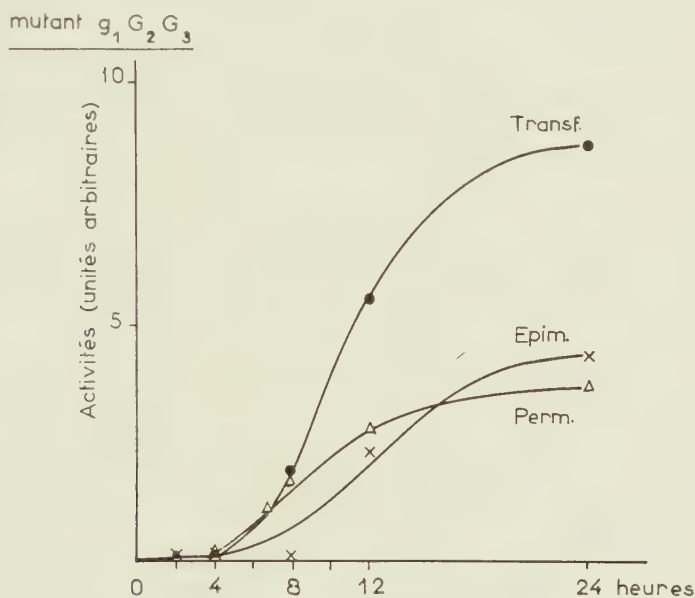


FIG. 42. — Induction des enzymes du métabolisme du galactose chez le mutant galactokinase-négatif, (génotype $g_1G_2G_3$).

Comme le montre cette figure, et comme il ressort également de l'examen du tableau 12 (chapitre 5.), on voit que les deux enzymes situées métaboliquement après la galactokinase, la Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase et l'UDPGal-4-épimérase, sont induites chez cette souche par le galactose libre, alors que les substrats de ces enzymes ne sont pas formés (cf. 5.2).

On voit que la cinétique d'induction de la Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase est tout à fait comparable à celle de la même enzyme, dans la souche CH-1. Toutefois, l'UDPGal-4-épimérase est induite plus lentement que la transférase.

La signification de ce phénomène « d'induction simultanée » (H. de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1957) sera discutée plus longuement à la fin de ce chapitre.

B) Corrélation entre le QO_2 -galactose et la teneur en enzymes :

Lorsque l'adaptation enzymatique est suivie par l'évolution de la capacité des cellules intactes à oxyder un substrat, le « taux d'adaptation » peut être défini comme

étant la « vitesse d'accroissement horaire du QO_2 », appelé AO_2 (cf. SŁONIMSKI, 1956).

SŁONIMSKI a montré, d'autre part, qu'il existe chez la levure, une corrélation satisfaisante entre l'évolution du QO_2 glucose au cours de l'adaptation respiratoire et le contenu en cytochrome-oxydase des broyats.

En ce qui concerne l'adaptation au galactose, SOHNIGEN et COOLHAAS (1924) avaient mis en évidence le parallélisme existant entre la quantité de CO_2 dégagé par des cellules intactes, fermentant le galactose, et la teneur en galactozymase de ces mêmes cellules. Toutefois, la mesure de l'activité galactozymasique reposait également sur des techniques manométriques, la nature des réactions catalysées par la « galactozymase » étant alors inconnue. Il avait ensuite été implicitement admis par les auteurs ayant étudié la formation induite de la galactozymase, que les activités respiratoires ou fermentaires mesurées reflétaient le contenu enzymatique, « galactozymase », des cellules.

Afin de permettre une interprétation valable des expériences d'adaptation effectuées dans l'appareil de Warburg, il était donc souhaitable de connaître la relation existant entre la capacité de respirer le galactose et la teneur en chacune des enzymes assurant le métabolisme de ce sucre.

Adaptation simple. — Au cours de l'expérience dont les résultats ont été représentés dans la figure 41, une partie aliquote des cellules de levure a été placée dans l'appareil de WARBURG, dans des conditions analogues à celles du reste de la suspension (sur laquelle les activités enzymatiques ont été mesurées), et la vitesse globale d'adaptation suivie par l'évolution du QO_2 sur galactose.

On voit, sur la figure 41, que la courbe obtenue suit de très près la cinétique d'apparition de la perméabilité envers le galactose ⁽¹⁾. Étant donné que dans les conditions employées, les cinétiques des trois enzymes étudiées sont très voisines, on peut dire que, dans son ensemble, la cinétique d'induction du système, mesurée par la respiration du galactose par les cellules intactes, reflète fidèlement la teneur en enzymes du galactose de ces mêmes cellules.

Dans les conditions standard utilisées (cellules en fin de croissance exponentielle, incubation aérobie, en présence de galactose à 2 p. 100, L-tryptophane 10 μ g/ml, tampon phosphate 0,1 M, pH 6,0), les AO_2 galactose ⁽²⁾ se situent entre 11 et 19, la moyenne de toutes les valeurs obtenues étant 15.

Adaptation double. — Lorsque les levures ayant effectué leur croissance en anaérobiose, sur glucose, sont mises en contact avec du galactose, elles doivent former à la fois les enzymes leur permettant d'utiliser le galactose, et les enzymes de la respiration terminale. Une telle « adaptation double » a déjà été utilisée par SŁONIMSKI (1956) pour son étude de l'énergétique de l'adaptation enzymatique chez les levures.

Au cours du présent travail, il a été constaté que le taux d'adaptation moyen sur galactose ($AO_2 = 15$) est le même, que l'on s'adresse à des cellules aérobies, possédant par conséquent toutes les enzymes respiratoires, ou à des cellules anaérobies, réalisant ensuite une adaptation double, respiration terminale et enzymes du galactose.

⁽¹⁾ Celle-ci, chez la souche CH-1, représente en fait l'accumulation de tréhalose, à partir de galactose, sous l'influence de la galactose-perméase (voir 5,3). Toutefois, comme cela a déjà été signalé au cours du chapitre précédent, les vitesses mesurées à l'aide de cette souche peuvent être considérées comme les vitesses maxima d'« entrée » du galactose, puisque le produit accumulé est différent du galactose et ne peut, par conséquent modifier l'équilibre de la réaction.

⁽²⁾ Au cours de ce chapitre, il sera parlé d' AO_2 glucose ou d' AO_2 galactose, selon que l'on mesure l'adaptation respiratoire, le substrat étant alors le glucose, ou l'adaptation au galactose.

Il ne semble donc pas que le fait de former adaptativement deux séries d'enzymes au lieu d'une, produise une inhibition, ni une stimulation, du taux de formation des enzymes du métabolisme du galactose. On pouvait donc penser que le facteur limitant la respiration en présence de galactose, au cours de l'adaptation double, était la quantité d'enzymes du métabolisme du galactose présentes, et non la quantité d'enzymes respiratoires.

Afin de vérifier cette hypothèse, une expérience a été effectuée dont les résultats sont représentés dans la figure 43. A des levures provenant d'une culture anaérobie, puis mises en contact aérobiquement avec le galactose, on a ajouté de l'éthanol à 2 p. 100, à deux moments différents.

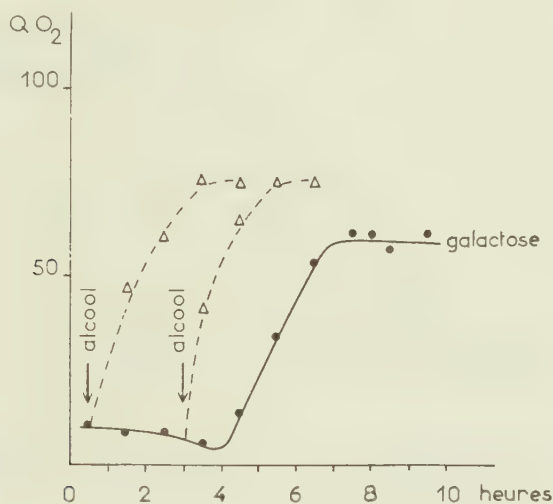


FIG. 43. — Mesure du potentiel respiratoire au cours de l'adaptation au galactose.
La capacité respiratoire est mesurée par addition d'éthanol (voir texte) aux moments indiqués par les flèches.
La respiration endogène a été déduite des valeurs obtenues.
Souche CH-1, cultivée en anaérobiose.

On voit que, surtout en ce qui concerne la seconde addition (après trois heures d'incubation avec le galactose), le potentiel respiratoire des cellules permet un QO_2 immédiat de 40 (au-dessus de l'endogène), alors que le QO_2 observé sur galactose seul n'est encore que de 7. Ces résultats montrent que, dans les conditions expérimentales employées, les enzymes de la respiration sont formées avant les enzymes du métabolisme du galactose. L'évolution des QO_2 galactose, même dans les conditions de l'adaptation double, dépend donc strictement de la formation des enzymes assurant le métabolisme du galactose.

C) Influence d'une source additionnelle d'énergie sur la vitesse de l'adaptation au galactose (AO_2 galactose)

SLONIMSKI, (1956), avait déjà observé que l'addition de petites quantités de glucose à des levures anaérobies (*S. cerevisiae*, Yeast foam), s'adaptant sur galactose, provoque une stimulation du taux de cette adaptation.

Les courbes de la figure 44 montrent qu'une telle stimulation est également observée avec la souche CH-1. On peut déduire de ces courbes que :

1) L' AO_2 glucose est limité par la quantité de glucose apportée : il est, dans cette expérience, égal à 6, pour 1 μ mole de glucose/ml, et égal à 8, pour une quantité double de glucose.

2) Lorsque l'adaptation a lieu en présence de galactose et des mêmes petites quantités de glucose, on voit que la courbe de l'adaptation suit deux pentes ; la

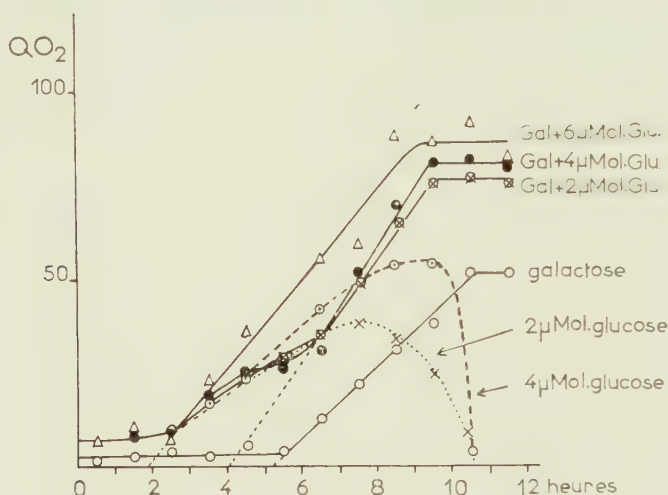


FIG. 44. — Adaptation double « galactose + respiration terminale » et influence de petites quantités de glucose sur cette adaptation.

Endogènes déduits.

S. cerevisiae, souche CH-1.

première est voisine de celle obtenue sur glucose seul, la seconde — démarrante lorsque le QO_2 glucose maximum n'est pas encore atteint (dans la cupule contenant le glucose seul) — est nettement plus forte que celle obtenue pour l'adaptation sur galactose seul.

Ces résultats sont confirmés par ceux de deux autres expériences indépendantes, résultats qui sont résumés dans le tableau 19. On voit que la dose de 6 μ moles de glucose est déjà trop élevée pour permettre de distinguer la consommation du glucose de celle du galactose.

On peut donc conclure de ces expériences que l'énergie fournie par l'utilisation aérobie du glucose, pendant le début de la formation induite des enzymes du métabolisme du galactose, augmente la vitesse avec laquelle ces enzymes sont formées.

D) Les enzymes du métabolisme du galactose. — Biosynthèse induite

Il était apparu, dès le début de ce travail, que l'adaptation au galactose de la souche CH-1, qui requiert le tryptophane pour sa croissance, est nulle ou très lente en absence de cet acide aminé. Cette observation montre qu'il s'agit très probablement d'une biosynthèse protéique *de novo*, puisque l'absence d'un acide aminé essen-

TABLEAU 19

*Effet de petites quantités de glucose sur l'adaptation η la respiration
en présence de glucose et de galactose*

Galactose	Glucose ajouté	AO ₂ -glucose		AO ₂ -galactose	
		(Exp. A)	(Exp. B)	(Exp. A)	(Exp. B)
—	2 %	9,5	11,0	—	—
2 %	—	—	—	8,0	11,0
—	1 μ mole	—	6,0	—	—
2 %	1 μ mole	—	—	—	12,0
—	1,5 μ moles	—	9,0	—	—
2 %	1,5 μ moles	—	—	—	12,0
—	2 μ moles	6,0	10,0	—	—
2 %	2 μ moles	—	—	6,0 (1 ^{re} pente) 15,5 (2 ^e pente)	13,0
—	3 μ moles	—	13,0	—	—
2 %	3 μ moles	—	—	—	13,0
—	4 μ moles	8,0	—	—	—
2 %	4 μ moles	—	—	9,5 (1 ^{re} pente) 12,5 (2 ^e pente)	—
—	6 μ moles	12,5	—	—	—
2 %	6 μ moles	—	—	12,5	—

tiel à la croissance suffit à bloquer la formation des enzymes assurant le métabolisme du galactose. De plus, il sera montré plus loin que l'addition de ce même acide aminé suffit à la rétablir. Il a été montré, par ailleurs, que la formation des enzymes du métabolisme du galactose est étroitement dépendante de la présence d'un métabolisme énergétique. Les deux critères qui avaient été définis au cours de l'introduction à ce chapitre — présence d'une source d'énergie métabolisable, présence de tous les acides aminés indispensables — se trouvent donc satisfaits, et l'on peut considérer qu'il s'agit dans ce cas d'une « biosynthèse induite ».

6.6 ÉTUDE COMPARATIVE DES VITESSES DE BIOSYNTHÈSE DE PLUSIEURS ENZYMES INDUCTIBLES

Dans le cas de la β -galactosidase de *E. coli*, le « taux différentiel de synthèse » (accroissement de la masse enzymatique mesurée par son activité par rapport à l'accroissement de la masse cellulaire) est une fonction linéaire, montrant ainsi que la β -galactosidase synthétisée représente toujours une fraction constante de l'ensemble des protéines synthétisées dans le même temps (MONOD, PAPPENHEIMER et COHEN-BAZIRE, 1952).

L'étude de la biosynthèse induite des protéines avait amené certains auteurs à introduire le concept de « biosynthèse préférentielle » (RICKENBERG et LESTER, 1955). Ce concept était fondé sur le fait que, au cours de la phase de latence qui sépare l'utilisation d'un substrat carboné (glucose ou maltose) de celle du lactose, la β -galac-

tosidase se trouve induite, sans augmentation notable de masse protéique. Il était donc tentant de penser que, dans certaines conditions, la biosynthèse des protéines inducibles pouvait avoir lieu sélectivement.

Cependant, les expériences de MANDELSTAMM (1957) ont montré qu'un "turn-over" protéique important existe chez *E. coli*, dans les conditions de non-croissance. Dans de telles conditions, la biosynthèse de la β -galactosidase peut encore être induite, mais elle s'établit à une vitesse qui est du même ordre de grandeur que le "turn-over" protéique mesurable.

Les conditions des expériences de MANDELSTAMM (1957) étant très voisines de celles employées par RICKENBERG et LESTER (1955), il semble très probable que la biosynthèse de la β -galactosidase observée par ces derniers auteurs s'accompagne d'un "turn-over" protéique. L'existence d'une biosynthèse protéique préférentielle dans le sens que lui attribuent RICKENBERG et LESTER — synthèse d'une espèce protéique définie dans des conditions qui ne permettent pas la synthèse des autres protéines cellulaires — semble donc très peu probable.

Lorsque l'on compare, chez la levure, les vitesses de formation de plusieurs enzymes adaptatives, induites en absence de croissance, on obtient pour certaines d'entre elles des allures très comparables, comme cela vient d'être montré dans le cas des enzymes du métabolisme du galactose (*cf.* fig. 41). Dans d'autres cas, cependant, tel que l'induction par l'oxygène des enzymes de la respiration terminale chez les levures, des différences plus importantes ont été trouvées dans les cinétiques d'induction des différentes enzymes.

Des travaux récents semblent indiquer qu'il s'agissait, au moins en ce qui concerne ce système, soit d'induction sub-optimale, soit d'un phénomène d'adaptation, différent d'une biosynthèse *de novo* :

— En effet, en ce qui concerne la cytochrome *c*-peroxydase, par exemple, SELS (1958a et b) a pu montrer que l'induction par le cytochrome *c* et l'O₂ (au lieu de l'O₂ seulement) suffit à rétablir une cinétique normale d'induction.

KATTERMAN et SLONIMSKI (1960) viennent de montrer que l'apparition de la L-lactico-cytochrome *c*-réductase en aérobiose, correspond vraisemblablement à une conversion de l'enzyme à spécificité D-lactique, qui se forme en anaérobiose.

Il est évident, toutefois, que la comparaison des vitesses de biosynthèse de deux enzymes différentes est assez délicate, puisque la mesure ne porte pas sur des quantités pondérables d'enzymes, mais sur des activités, généralement exprimées en unités arbitraires. On ignore, dans la plupart des cas, le poids moléculaire et, par conséquent, l'activité moléculaire spécifique des enzymes étudiées. Néanmoins, si l'on possède un facteur permettant de limiter la synthèse protéique de manière quantitative, il est possible d'étudier comparativement l'influence de ce facteur sur la vitesse de biosynthèse de plusieurs enzymes. C'est pourquoi il m'a semblé que l'exigence de la souche CH-1 pour le tryptophane était propre à permettre une telle comparaison.

A) Choix du système enzymatique de comparaison

La formation des enzymes de la respiration terminale est inhibée par plusieurs analogues d'acides aminés (SLONIMSKI, 1956). Des expériences récentes (KATTERMAN et SLONIMSKI, 1960) montrent qu'il s'agit très probablement d'une biosynthèse *de*

nov, pour au moins deux des enzymes de ce système complexe : la cytochrome-oxydase et la succino-cytochrome *c*-réductase. On sait, d'autre part (SLONIMSKI, 1956) que le QO_2 glucose observé au cours de l'adaptation respiratoire est proportionnel à la quantité de cytochrome-oxydase présente. C'est pourquoi il m'a semblé que le système de la respiration terminale chez la levure offrait des critères équivalents à ceux du système du métabolisme du galactose, définis précédemment.

Ces deux systèmes présentent par ailleurs des différences importantes, concernant :

- L'inducteur : oxygène, pour l'un, galactose pour l'autre.
- La fonction : activation de l'oxygène, transport d'électron pour l'un ; phosphorylation, transport d'un groupement nucléotidique, épimérisation, pour l'autre.
- La structure : groupements prosthétiques flavo-hémoprotéiques dans un cas ; pas de groupement prosthétique connu, dans l'autre cas.
- La localisation intracellulaire : enzymes partiellement ou totalement associées aux particules cytoplasmiques dans un cas ; totalement solubles, dans l'autre cas.

B) Comparaison de l'effet du tryptophane sur la vitesse de la biosynthèse induite dans les deux systèmes enzymatiques choisis :

Les expériences ont été effectuées à l'aide de la souche CH-1. Il avait tout d'abord semblé souhaitable d'obtenir une adaptation aussi faible que possible en absence de tryptophane. Toutefois, les essais effectués après carence en tryptophane se sont

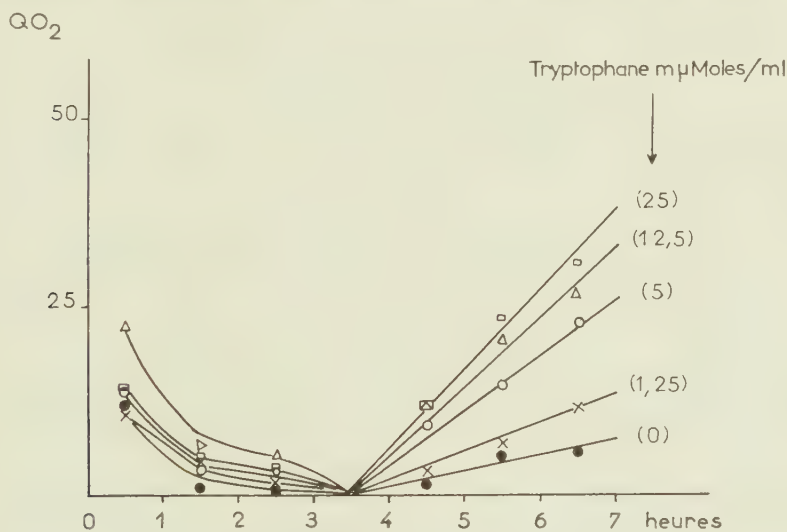


FIG. 45. — Adaptation à la respiration en présence de galactose et sa stimulation par le tryptophane.

Les valeurs mises entre parenthèses représentent la quantité de tryptophane ajoutée en mμ moles par ml et par 0,5 mg de poids sec.

révélés peu encourageants, les cellules obtenues étant fréquemment peu ou pas adaptables, même en présence de tryptophane ajouté.

Néanmoins, comme le montre la figure 45, les cellules (prélevées à la fin de la

phase exponentielle) présentent un AO_2 galactose très faible, en absence de tryptophane exogène. Il semble vraisemblable que la légère synthèse que l'on observe avec des cellules non-carencées (sans addition de tryptophane) soit due à un apport endogène (« turn-over » protéique).

On voit, sur la figure 45, qu'après une période de latence, pendant laquelle les QO_2 endogènes sont retombés à une valeur négligeable, l'adaptation commence partout à se produire au cours de la 4^e heure, quelle que soit la quantité de tryptophane ajoutée, et même en absence de tryptophane exogène. Il semble donc que la présence de tryptophane n'a aucun effet sur la durée de la période de latence. Au contraire, les vitesses d'adaptation obtenues sont d'autant plus rapides que la quantité de tryptophane ajoutée est plus grande.

Des résultats semblables sont obtenus lorsqu'on étudie l'adaptation respiratoire de levures cultivées en anaérobiose. Les levures anaérobies permettent, de plus, comme cela a été montré précédemment, d'étudier l'adaptation au galactose, indépendamment de l'adaptation respiratoire.

Les résultats de cette étude comparative sont résumés dans le tableau 20. On voit que la stimulation produite par des doses croissantes de tryptophane (0 à 625 μ moles par ml et par 0,5 mg P. s.) est du même ordre de grandeur, qu'il s'agisse de l'adaptation respiratoire, de l'adaptation au galactose, ou de l'adaptation double. La saturation (obtention d'un AO_2 moyen de 11) est obtenue, dans les trois cas, pour une dose de tryptophane égale à 25 μ moles.

TABLEAU 20

*Effet du tryptophane sur l'adaptation à la respiration
en présence de glucose et de galactose*

Souche CH-1, génotype $g_1G_2G_3/G_1g_2G_3$

L-tryptophane ajouté (μ moles/ml et par 0,5 mg poids sec)	0	1,25	5	12,5	25	125	250	625
<i>Adaptation respiratoire</i> (levures anaérobies s'adaptant à la respiration en présence de glucose)								
Moyenne des AO_2 glucose....	5	8	8	9,5	11	—	10,5	12
(Nombre de déterminations)..<	(5)	(1)	(2)	(3)	(2)	—	(2)	(2)
<i>Adaptation au galactose</i> (levures aérobies s'adaptant à la respiration en présence de galactose)								
Moyenne des AO_2 galactose ..	3,5	4,5	7	9	11,5	—	—	14
(Nombre de déterminations)..<	(5)	(1)	(2)	(2)	(2)	—	—	(4)
<i>Adaptation double</i> (levures anaérobies s'adaptant à la respiration en présence de galactose)								
Moyenne des AO_2 galactose ..	5,5	6	7	7,5	11	11	10	11
(Nombre de déterminations)..<	(5)	(1)	(2)	(3)	(2)	(2)	(1)	(2)

Ces résultats montrent, par conséquent que les vitesses de la biosynthèse induite des deux systèmes étudiés sont influencées de façon similaire par la concentration exogène d'un acide aminé indispensable, le tryptophane. Il ne semble donc pas qu'il y ait lieu d'admettre, dans ce cas précis, une synthèse préférentielle de l'un des systèmes étudiés par rapport à l'autre.

C) Effet du tryptophane sur la quantité totale d'enzymes formées

On pouvait également se demander si la concentration en tryptophane n'exerçait pas un effet sur la quantité finale d'enzymes formées. Dans la plupart des expériences qui ont été effectuées au cours de ce travail, il n'a pas été possible de poursuivre les mesures pendant un temps suffisamment long. Cependant, dans deux cas, pour des doses limitantes de 5 et 12,5 μ moles de tryptophane, les QO_2 finaux ont atteint la valeur observée sur glucose, en présence d'un excès de tryptophane. Ces deux résultats permettent par conséquent de supposer que la limitation en tryptophane est sans effet sur la teneur finale en enzymes.

6.7 ADAPTATION EN ANAÉROBIOSE

A) Cellules non-proliférantes :

Toutes les expériences d'adaptation dont il a été question jusqu'à maintenant ont été effectuées en aérobiose. Les nombreux essais que j'ai effectués au cours de ce travail pour obtenir l'adaptation de cette souche de *S. cerevisiae*, CH-1, en anaérobiose et en absence de croissance, ont tous été négatifs.

Les expériences de LINDENGREN et PALLERONI (1952) avaient montré que l'adaptation en anaérobiose observée par REINER et SPIEGELMAN (1947) était due, dans la plupart des cas, à la présence de glucose dans le galactose utilisé par ces derniers auteurs. Les résultats négatifs que j'ai obtenus pouvaient donc provenir de ce que le galactose utilisé comme inducteur et substrat au cours de ce travail était trop pur. Cependant, comme le montre la figure 46, l'addition de quantités de glucose allant jusqu'à 12 μ moles (ce qui permet d'assurer pendant 6 à 9 heures une fermentation importante) n'a pas permis l'adaptation de cette souche en anaérobiose. Il en est de même lorsque le glucose est ajouté à des temps variables, après le début de l'incubation.

Ces expériences ont été répétées à l'aide de deux autres souches diploïdes, de type sauvage, Yeast foam (*S. cerevisiae*), et *S. fragilis*. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 47. On voit que, en présence de 10 μ moles de glucose l'adaptation de la souche Yeast foam commence après une période de latence de trois heures. Toutefois, la vitesse de l'adaptation est très lente : $ACO_2 = 4$. On sait en effet que les AO_2 sont généralement de l'ordre de 15. De plus, le QO_2 optimum étant environ 120, l'adaptation complète requiert environ 8 heures, mais le QCO_2 optimum étant environ 300, un ACO_2 de 4 signifie que l'adaptation complète demanderait environ 75 heures :

L'adaptation anaérobie de *S. fragilis* est, par contre, beaucoup plus rapide. Après trois heures d'incubation, le CO_2 dégagé rend compte de 80 p. 100 du glucose ajouté, ce qui correspond à l'utilisation complète du glucose telle qu'elle peut être mesurée dans les mêmes conditions, environ 20 p. 100 de ce sucre étant « assimilé ». La fermentation se poursuit pourtant au-delà de cette période, le QCO_2 étant environ 100 après 5 heures. Si l'on suppose que l'adaptation ait commencé immédiatement après l'addition du galactose, ceci correspondrait à un ACO_2 minimum égal à 20.

Cette étude n'a pas été poussée plus avant, mais on voit que la faculté de s'adapter anaérobiquement au galactose peut être très différente selon les souches. Plu-

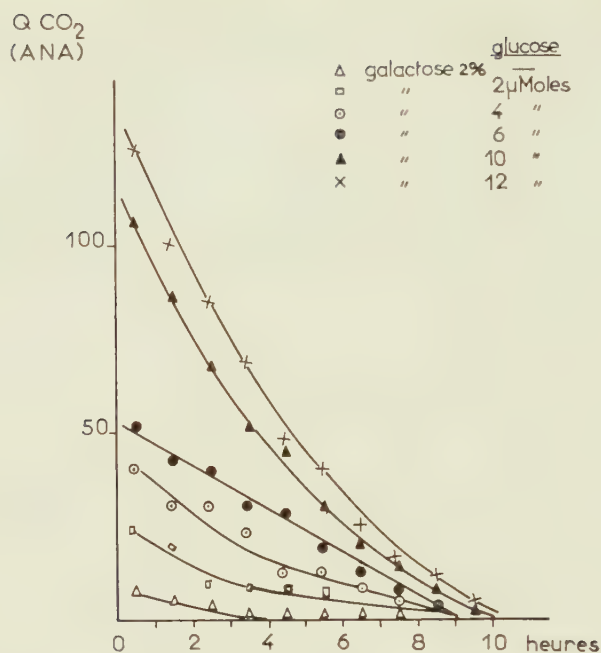


FIG. 46. — Essai d'adaptation anaérobie de la souche CH-1 (*S. cerevisiae*) en absence et en présence de petites quantités de glucose.

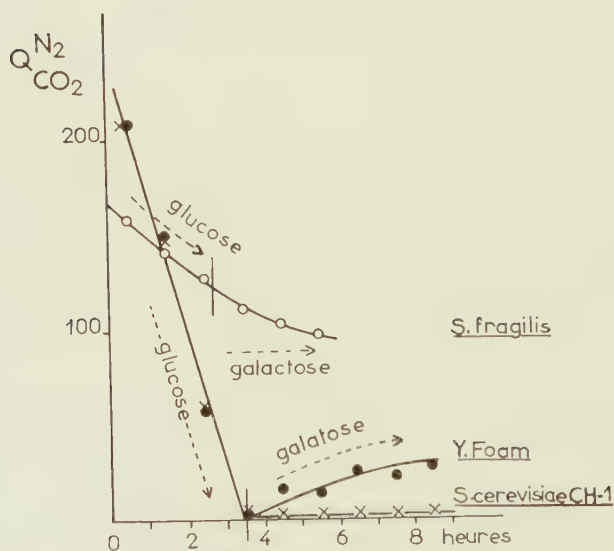


FIG. 47. — Adaptation au galactose en présence de 10 μ moles de glucose, pour différentes souches de levure.

La première partie de chacune des courbes (jusqu'au trait vertical) correspond à l'utilisation anaérobie du glucose ajouté ; la deuxième partie correspond à l'utilisation du galactose.

sieurs hypothèses pourraient être avancées pour expliquer ces différences : — capacité de former des réserves endogènes fermentescibles, — perméabilité au galactose, différentes en anaérobiose, — différence dans la capacité d'éliminer un répresseur endogène, plus stable en anaérobiose qu'en aérobiose.

B) Cellules proliférantes :

L'incapacité présentée par la souche CH-1 de s'adapter anaérobiquement à l'utilisation du galactose n'est cependant pas absolue. Les cellules de cette souche, provenant de cultures aérobies ou anaérobies en milieu 3S glucose, ne présentent qu'une croissance très faible, même après cinq jours de contact avec le galactose en milieu naturel 3S. Elles restent cependant capables de s'adapter aérobiquement au galactose. Mais si le milieu 3S galactose est additionné de 0,1 p. 100 de glucose on constate que la croissance se poursuit, après épuisement du glucose. Les cellules ainsi obtenues sont alors capables de fermenter anaérobiquement le galactose avec des QCO_2 approchant, ou égaux, à ceux des cellules adaptées aérobiquement, puis cultivées en anaérobiose sur galactose.

Ces résultats permettent de dresser un tableau comparant les capacités des trois souches considérées à effectuer la biosynthèse des enzymes du métabolisme du galactose :

	S. fragilis	S. cerevisiae	
		Yeast foam	CH-1
<i>Cellules non-proliférantes :</i>			
en aérobiose	+++	+++	+++
en anaérobiose	+++	+	0
<i>Cellules proliférantes :</i>			
en aérobiose	+++	+++	+++
en anaérobiose	+++	+++	++

6.8 RELATIONS EXISTANT ENTRE RESPIRATION, FERMENTATION AÉROBIE ET FERMENTATION ANAÉROBIE DU GALACTOSE

Au cours de l'adaptation aérobie de la souche CH-1 sur galactose, l'évolution de la capacité de fermenter le galactose à l'air (QCO_2 (ferm.)) a été suivie.

Dans le cas de l'adaptation respiratoire, les cellules possèdent une capacité fermentaire vis-à-vis du substrat. Celle-ci, égale au départ au QCO_2 (environ 300), baisse au cours de l'adaptation respiratoire, par suite de l'installation d'un « effet Pasteur ».

Dans le cas du galactose, on constate que le QCO_2 (ferm.) est nul au début de l'adaptation et n'augmente que lentement au fur et à mesure que l'adaptation (mesurée par l'accroissement du QO_2) progresse.

Si l'on porte les QCO_2 (ferm.) obtenus au cours de plusieurs expériences, en fonction des QO_2 correspondants, on constate que tous les points, à une exception

près, se placent sur une droite (voir figure 48). On voit donc qu'après un certain retard, chaque accroissement du QO_2 correspond à un accroissement égal du QCO_2 (ferm.). Toutefois, lorsqu'on atteint le QO_2 optimum, le QCO_2 (ferm.) cesse de s'accroître. On n'atteint donc jamais les valeurs élevées de QCO_2 auxquelles on devrait théoriquement s'attendre.

Ces résultats pourraient, à première vue, s'interpréter sur la base d'un « effet Pasteur » qui serait beaucoup plus marqué, ou beaucoup plus immédiat avec le galactose qu'avec le glucose. Toutefois, si l'on mesure le $Q_{O_2}^{N_2}$ des mêmes cellules, on constate que la capacité fermentaire aérobie, ou anaérobie des cellules ayant effectué leur adaptation ou leur croissance en aérobiose sur galactose, est toujours très faible. Dans trois expériences indépendantes les trois valeurs QO_2 , $Q_{O_2}^{N_2}$, et QCO_2 (ferm.) ont été mesurées sur une même suspension cellulaire. L'effet Pasteur

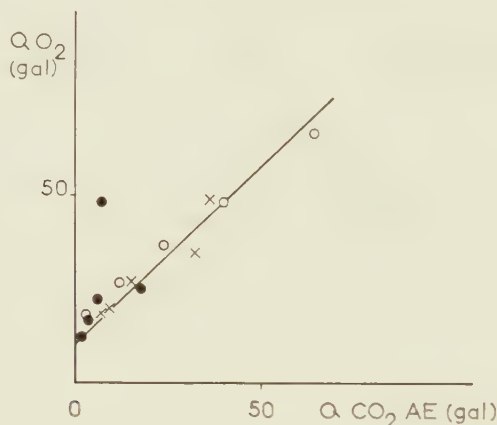


FIG. 48. — Relation entre les QO_2 et les QCO_2 aérobies de levures s'adaptant au galactose en aérobiose.

S. cerevisiae CH-1 ; les endogènes ont été déduits.

peut donc être calculé d'une manière approximative, par l'application de la formule :

$$Q_{CO_2}^{N_2} = \frac{QCO_2 \text{ (ferm.)}}{QO_2}$$

Les valeurs obtenues sont les suivantes : 0,2 ; 0,3 et 0. On voit qu'il y a donc ici absence absolue d'effet Pasteur.

Les résultats précédents peuvent toutefois s'expliquer très aisément si l'on admet que ce qui limite l'acquisition d'un QCO_2 élevé est la quantité d'enzymes du galactose présentes.

En effet, on sait que le K_m de la respiration en présence de glucose est environ 5×10^{-4} M tandis que celui de la fermentation de ce sucre est de l'ordre de 1×10^{-2} M.

On peut donc concevoir que des quantités sub-optimales d'enzymes du métabolisme du galactose pourraient permettre seulement la saturation du système respiratoire, mais non celle du système fermentaire.

Dans la figure 49 sont rassemblés les résultats des mesures effectuées au cours d'une série d'expériences indépendantes, concernant les valeurs de QO_2 et de $Q_{CO_2}^{N_2}$.

présentées par des levures ayant effectué leur adaptation au galactose en aérobiose. Les capacités respiratoires ou fermentaires vis-à-vis du glucose n'étant pas toujours identiques d'une expérience à l'autre (traduisant des états physiologiques légèrement différents), les résultats ont été exprimés en p. 100 de la valeur correspondante sur glucose.

On voit que si l'adaptation aérobie sur galactose permet d'obtenir des QO_2 galactose identiques aux QO_2 glucose, il n'en est pas de même pour les QCO_2 . En effet, ces derniers ne dépassent pas 50 p. 100 de la capacité fermentaire observée sur glucose.

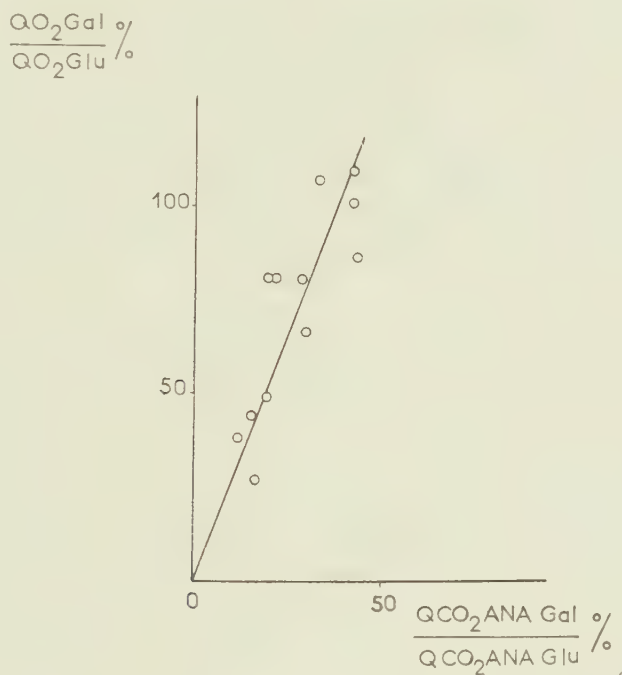


FIG. 49. — Relation entre la capacité de respirer et la capacité de fermenter le galactose.
S. cerevisiae CH-1.

Les valeurs obtenues ont été rapportées à celles obtenues avec le glucose pour les mêmes suspensions.

Il ne peut, dans ce cas, être question d'effet Pasteur, comme cela a été montré précédemment. Au contraire, l'hypothèse d'un potentiel enzymatique insuffisant pour assurer un taux de fermentation optimum, permet de rendre compte des résultats.

Il est, de plus, remarquable que ce sont seulement les cellules cultivées en anaérobiose sur galactose (après préinduction aérobie) qui ont permis d'obtenir des QCO_2 anaérobies élevés et égaux aux QCO_2 observés sur glucose.

L'étude comparative de la teneur en enzymes du métabolisme du galactose présentes, dans des cellules cultivées ou induites, dans diverses conditions, semblait donc indispensable.

6.9 TENEUR EN ENZYMES DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE EN RAPPORT AVEC LE MODE D'ADAPTATION

La souche CH-1 (*S. cerevisiae*, diploïde, galactose positive) a été cultivée, ou induite, dans les conditions suivantes :

1. Croissance sur milieu naturel 3S-glucose
 - en aérobiose
 - en anaérobiose.
2. Croissance sur milieu 3S-glucose, puis incubation en anaérobiose en milieu 3S-galactose, pendant 3 à 5 jours.
3. Croissance sur milieu 3S-galactose, en aérobiose.
4. Croissance sur milieu 3S-galactose + 0,1 p. 100 glucose.
5. Croissance sur milieu 3-S galactose, en aérobiose, puis en anaérobiose.

Les enzymes suivantes ont été dosées dans les conditions habituelles : Galactokinase, Gal-1-P G-1-P uridyltransférase, UDPGal-4-épimérase, G-1-P PP uridyltransférase, Phosphoglucomutase, et Glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Les résultats de cette étude, rapportés à 1000 unités de G-6-P déshydrogénase, sont consignés dans le tableau 21 dans lequel sont également rappelées les valeurs

TABLEAU 21

*Activité des enzymes du métabolisme du galactose après culture
dans différentes conditions*

Unités pour 1 000 U. de G-6-P déshydrogénase.

K : Galactokinase
T : Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase
E : UDPGal-4-épimérase
PP : G-1-P/PP uridyltransférase
PGM : Phosphoglucomutase.

Les extraits et dosages ont été effectués selon les techniques habituelles (voir tableaux précédents).

Conditions d'induction (milieu naturel 3S)	Nb. exp.	K	T	E	PP	PGM	Q $\frac{N_2}{CO_2}$ Gal/Glu %
I. Non induites { AE.....	2	0,2	0,2	0,1	198	91	0
ANA.....	2	0,2	0,3	0,1	209	82	0
II. Incubées, ANA — Gal.....	4	15	70	22	234	109	0 à 20 %
III. Induites, AE — Gal.....	2	43	189	68	274	165	env. 50 %
IV. Incubées, ANA — Gal + Glu	2	156	456	45	246	271	80 à 100 %
V. Pré-induites, AE — Gal, puis Cultivées, ANA — Gal.....	3	135	475	72	270	440	100 %
Augmentation maximum d'activité		780 X	2 375 X	720 X	1,4 X	5,1 X	
Augmentation d'activité entre aérobiose et anaérobiose (ANA V/AE III)		3,1 X	2,5 X	0	0	2,7 X	env. 2X

moyennes des $Q\frac{N_2}{CO_2}$ -galactose (en p. 100 du QCO_2 -glucose correspondant), obtenues pour les cellules intactes, après culture, ou induction, dans ces différentes conditions.

On voit que :

- 1) Ici encore les teneurs en enzymes du métabolisme du galactose sont très

faibles dans les cellules non-induites, et augmentent considérablement après culture sur galactose.

2) Les cellules cultivées en anaérobiose sur galactose (conditions -4, et -5.) sont plus riches en galactokinase et en Gal-1-P-G-1-P uridylyltransférase que les cellules cultivées sur galactose en aérobiose (condition -3). La teneur en UDPGal-4-épimérase demeure constante.

3) Comme cela avait été montré dans le chapitre 4, la teneur en G-1-P/PP uridylyltransférase varie peu, quelles que soient les conditions de culture ou d'induction.

4) Par contre, il est surprenant de constater que la teneur en phosphoglucomutase varie considérablement. Ces variations ne sont pas en relation avec le fait que la culture a été effectuée en aérobiose ou en anaérobiose, comme le montrent les valeurs obtenues pour les cellules non-induites. On voit qu'elles sont au contraire en relation directe avec le fait que la croissance a été effectuée en présence de galactose.

5) Si l'on considère les rapports des valeurs obtenues en anaérobiose-galactose (condition -5.) et en aérobiose-galactose (condition -3.), on constate que la variation est du même ordre de grandeur pour les trois enzymes, galactokinase, Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase, et phosphoglucomutase, qui augmentent respectivement 3 fois, 2,5 fois, et 2,7 fois quand on passe des conditions de culture aérobies aux conditions anaérobies.

6) Les cellules ayant été induites en anaérobiose, sans croissance (condition -2), ne renferment que très peu d'enzymes.

7) Il existe une certaine corrélation entre les Q_{CO_2} -galactose observés et les teneurs en enzymes pour les différentes classes étudiées.

Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse qui avait été formulée précédemment, selon laquelle ce qui limite la capacité des levures adaptées aérobiquement au galactose, à fermenter ce sucre avec des Q_{CO_2} (ferm.), ou des $Q_{CO_2}^{N_2}$ élevés, est la teneur en enzymes du métabolisme du galactose. Il semble donc que, dans toutes les conditions étudiées, les valeurs de Q_{O_2} , Q_{CO_2} (ferm.) et $Q_{CO_2}^{N_2}$, reflètent fidèlement l'équipement enzymatique de la cellule. Les conséquences de ces observations seront envisagées d'une manière plus détaillée au cours de la discussion de ce chapitre.

6.10 DISCUSSION

Un certain nombre de points qui résultent des expériences présentées au cours de ce chapitre seront discutés ici. Certains d'entre eux seront toutefois à nouveau évoqués au cours de la discussion générale (cf. 7).

1) *Caractère inductible des quatre enzymes du métabolisme du galactose chez S. cerevisiae et S. fragilis.*

Les résultats obtenus ont tout d'abord confirmé ce qui ressortait déjà des expériences présentées au cours du chapitre précédent, à savoir, le caractère inductible, des quatre enzymes du métabolisme du galactose : Galactose-perméase, Galactokinase, Gal-1-P G-1-P uridylyltransférase, et UDPGal-4-épimérase, chez *S. cerevisiae*. Il a, de plus, été montré qu'il en est de même chez *S. fragilis*. Le désaccord entre ces derniers résultats et ceux de MILLS et coll. (1957) concernant la présence de

l'UDPGal-4-épimérase chez une souche de *S. fragilis* non-induite, n'a pu être expliqué.

Le caractère adaptatif des enzymes du métabolisme du galactose semblait à peu près certain. En effet, les auteurs ayant effectué des préparations de certaines de ces enzymes ou des produits de leur métabolisme chez la levure, avaient trouvé qu'il était nécessaire d'employer des cellules ayant effectué leur croissance en présence de galactose (*cf.* TRUCCO et coll., 1948 ; KALCKAR et coll., 1953 ; LELOIR, 1951). Il n'y avait cependant, dans ces travaux aucune indication précise de la quantité d'enzymes pouvant pré-exister dans les cellules non-induites.

Les expériences effectuées au cours de ce travail ont permis de préciser que les quantités d'enzymes présentes dans les cellules non-induites (*S. cerevisiae* ou *S. fragilis*) étaient dans tous les cas inférieures à 1 p. 100 des quantités présentes dans les cellules induites.

Les quatre enzymes du métabolisme du galactose apparaissent donc comme étant pleinement inductibles.

2) Induction chez le mutant 1235/2b. — « Adaptation simultanée ».

Les expériences qui ont été effectuées au cours de ce travail montrent que le schéma de l'« induction séquentielle » (STANIER, 1950) ne s'applique pas au cas des enzymes du métabolisme du galactose, chez la levure.

En effet, l'étude enzymatique du mutant de génotype $g_1g_2g_3$, galactokinase négatif, a montré que, après induction, les deux enzymes du métabolisme du galactose, situées après la galactokinase, ainsi que la galactose-perméase, étaient présentes en quantités comparables à celles trouvées dans les autres souches induites. (voir tableau 12).

Les résultats présentés dans le précédent chapitre ont montré, d'autre part, que ce mutant ne formait aucune trace décelable de Galactose-1-Phosphate. Il ne peut donc, à plus forte raison, y avoir formation d'UDPGal. L'inducteur commun de ces deux enzymes, ainsi que de la galactose-perméase dans cette souche est, par conséquent, le galactose libre.

D'autre part, il paraît hautement vraisemblable que le galactose doit également, chez les souches portant l'allèle G_1 , être l'inducteur de la galactokinase, dont il est le substrat.

Ces résultats m'ont amenée à formuler l'hypothèse de l'« induction simultanée⁽¹⁾ des enzymes du métabolisme du galactose (de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1957), le galactose étant considéré comme l'inducteur polyvalent de toutes les enzymes assurant son métabolisme.

Ceci ne signifie pas que, dans les conditions où les enzymes du métabolisme du galactose exercent leur activité, cette induction ne puisse être renforcée par la présence du substrat de l'enzyme. Les légères différences existant entre les cinétiques d'induction des diverses enzymes, chez CH-1 et chez 1235/2b, pourraient être expliquées de cette manière. Mais il n'en reste pas moins que la molécule du galactose possède à elle seule toute l'information nécessaire à l'induction des quatre enzymes. Les rapports de ce mode d'induction avec le concept plus général de la « répression enzymatique » seront discutés plus loin (voir 7.).

(1) Le terme d'« induction simultanée » avait été par erreur employé par STANIER (1950) dans le sens d'« induction séquentielle ». Ce terme doit être compris ici dans le sens d'induction polyvalente ou pléiotrope.

3) *Induction des enzymes du métabolisme du galactose chez la souche 1238/5d.*

Les expériences d'adaptation effectuées à l'aide du mutant de génotype $G_1g_2G_3$, galactose-perméase-négatif, montrent que l'induction des enzymes du métabolisme du galactose peut avoir lieu en absence de la galactose-perméase. Toutefois, la concentration de galactose requise est, au moins dans certains cas, supérieure à celle qui induit les enzymes de la souche de génotype $g_1G_2G_3$. La concentration du galactose intracellulaire serait ainsi l'un des facteurs déterminants de l'induction.

L'étude des cinétiques d'induction des différentes enzymes (au sein des différents génotypes), en présence de concentrations variées de galactose, permettrait de se faire une idée plus exacte de la concentration minimum capable de provoquer la biosynthèse induite des enzymes considérées, et de mesurer ainsi l'« affinité » entre le galactose et le (ou les) site(s) de biosynthèse de ces enzymes.

4) *Comparaison des cinétiques d'induction.*

Les cinétiques d'induction de la capacité de concentrer le galactose sont très différentes selon le génotype des souches. La galactose-perméase est synthétisée d'une manière à peu près linéaire chez la souche 1235/2b ($g_1G_2G_3$) galactokinase négative. Au contraire, l'augmentation de la perméabilité envers le galactose chez CH-1 qui, rappelons-le, correspond à la combinaison de l'action de la perméase et des enzymes du métabolisme du galactose et conduit à l'accumulation de « tréhalose », revêt la forme d'une courbe en S.

On peut se demander s'il est possible d'interpréter ces différentes cinétiques sur la base d'un métabolisme énergétique différent. En effet, dans une cellule incapable de métaboliser le galactose (1235/2b), la galactose-perméase se forme linéairement, une telle cellule ne disposant que d'une source énergétique d'origine endogène, à débit constant. Par contre, dans une cellule potentiellement capable de métaboliser le galactose (CH-1), toute induction de la galactose-perméase entraîne l'induction et le fonctionnement des enzymes du métabolisme du galactose. Il en résulte donc un apport énergétique croissant qui pourrait permettre une synthèse exponentielle de la galactose-perméase.

Ceci peut être rapproché des observations de SPIEGELMAN et coll. (1950) montrant également une courbe exponentielle pour l'induction de la « galactozymase » chez les souches portant le caractère « slow » (allèle g_3). Comme il a été suggéré dans la discussion du chapitre précédent, on pourrait penser que l'induction de la galactose perméase, chez les souches portant l'allèle g_3 , est particulièrement lente à cause d'une limitation énergétique importante. Il suffirait donc que l'apport énergétique nécessaire à la biosynthèse de la galactose-perméase soit plus important que celui nécessaire à la synthèse des enzymes métaboliques, pour expliquer l'aspect autocatalytique du phénomène. S'il en était ainsi, il ne serait même pas nécessaire que la réaction contrôlée par le gène g_3 ait un rapport direct avec les enzymes du métabolisme du galactose. Elle pourrait, par exemple, concerner un métabolisme endogène extrêmement réduit, auquel cas toute la biosynthèse induite des enzymes serait dépendante de l'énergie apportée par l'acquisition de la première molécule de perméase, et se prolongerait ensuite auto-catalytiquement. Cette interprétation est en accord avec celle proposée par POLLOCK (1959).

Une autre interprétation plus spécifique du phénomène est cependant concevable, interprétation qui sera présentée au cours de la discussion finale (cf. 7.).

5) *Phase de latence précédant l'adaptation.*

Certaines expériences présentées au cours de ce chapitre ont montré que la durée de la phase de latence peut être considérablement réduite par l'apport de petites quantités de glucose, et qu'il existe une relation très nette entre l'importance de cette réduction et la quantité de glucose ajoutée (entre 1 et 25 μ moles). Ces expériences montrent, par conséquent, que la quantité d'énergie disponible pour les synthèses représente un facteur important dans la durée du temps de latence.

Le fait que des sources de carbone autres que le glucose (lactate, acétate, glycérol), bien que permettant d'assurer des QO_2 au moins égaux à ceux obtenus avec des quantités de glucose aussi petites que 1 μ mole, restent néanmoins sans effet, indique que le rôle du glucose dans la diminution de la période de latence n'est pas exclusivement d'ordre énergétique. Il est assez tentant de penser que la phase de latence pourrait correspondre, soit à l'accumulation, soit à l'élimination, de composés permettant, ou inhibant, la biosynthèse induite des protéines : le glucose ou un métabolite provenant du glucose, aurait un effet stimulateur sur ce processus.

Ces observations peuvent être rapprochées du phénomène d'« adaptabilité » des levures anaérobies (SLONIMSKI, 1956) et du fait que certains composés dérivés des sucres permettent de modifier considérablement la capacité de former les enzymes respiratoires (SLONIMSKI et de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1957 ; SLONIMSKI, ASSELINEAU et LEDERER, 1959).

6) *Contrôle exercé par le tryptophane sur la cinétique d'induction.*

Il a été montré au cours de ce chapitre que le fait qu'un acide aminé soit indispensable à la croissance peut être utilisé pour contrôler le taux de biosynthèse de plusieurs enzymes inductibles chez la levure. Deux systèmes enzymatiques ont été comparés : les enzymes de la respiration terminale, et les enzymes du métabolisme du galactose.

Cette étude a été effectuée en suivant l'évolution du QO_2 -glucose ou -galactose, de levures aérobies ou anaérobies.

Rappelons qu'il a été montré (SLONIMSKI, 1956) qu'une corrélation satisfaisante existe entre les QO_2 -glucose et la teneur en cytochrome-oxydase, chez la levure. D'autre part, les expériences présentées ici ont permis de mettre en évidence la corrélation existant entre les QO_2 -galactose et les quantités de galactose-perméase, Gal-1-P/G-1-P uridyltransférase et UDPGal-4-épimérase, présentes.

Il ne peut cependant pas être exclu qu'au cours du processus d'adaptation, de faibles variations dans les vitesses respectives de biosynthèse suffisent à rendre limitante, tantôt l'une, tantôt l'autre, de ces enzymes. Les résultats obtenus représentent par conséquent, soit une valeur moyenne de fluctuations internes, soit la valeur minimum imprimée par l'enzyme limitante à l'activité de chaque système. Il n'en reste pas moins un parallélisme évident dans les effets de la concentration en tryptophane sur les vitesses de biosynthèse de chacun de ces deux systèmes et qui doit donc s'appliquer, soit à l'enzyme qui, dans chaque cas, est limitante, soit à l'ensemble des composants des deux systèmes.

Ces expériences montrent donc que, dans les conditions expérimentales employées (absence de croissance, absence d'une source d'énergie exogène, etc.) il n'y a pas lieu d'admettre une synthèse préférentielle des enzymes de l'un des systèmes par rapport à l'autre.

Il est intéressant de remarquer que, quelles que soient les conditions dans lesquelles la biosynthèse des enzymes étudiées s'effectue, celle-ci est toujours représentée par une droite. C'est ce à quoi l'on devrait s'attendre si l'a concentration intracellulaire en tryptophane constitue, dans ces conditions, le facteur limitant de l'activité des « sites formateurs d'enzymes ». Au contraire, l'augmentation du nombre de « sites formateurs d'enzymes » devrait conduire à une cinétique de second ordre. Cette limitation est la même (ou tout au moins du même ordre de grandeur) pour des sites correspondant à des protéines différentes (voir aussi discussion générale).

Il est évident que cet artifice expérimental peut être mis à profit dans l'étude d'autres paramètres concernant la biosynthèse induite des protéines.

7) *Spécificité de l'induction.*

Il a été mentionné au cours de ce chapitre que, de tous les composés essayés, seul le D-galactose s'était révélé être un inducteur exogène des enzymes de son métabolisme. La signification de l'induction simultanée des enzymes du métabolisme du galactose a été discutée précédemment.

L'induction de l'UDPGal-4-épipimérase pose d'une manière très précise le problème de la spécificité de l'induction. En effet, l'UDPG est un substrat de l'UDPGal-4-épipimérase, au même titre que l'UDPGal (l'équilibre de la réaction étant 1-UDPGal pour 3-UDPG) et les levures contiennent toujours de l'UDPG en quantité relativement importante (*cf.* LELOIR, 1951). Cependant l'UDPG, bien que substrat, n'est pas un inducteur de l'UDPGal-4-épipimérase, chez la levure. Par contre, la formation de cette enzyme est induite par le galactose libre qui n'en est pas un substrat. La molécule du galactose possède donc à elle seule l'« information » nécessaire à l'induction de cette enzyme, information qui est contenue probablement aussi dans la molécule du substrat UDPGal, mais est absente de la molécule du substrat UDPG.

Cette observation est à rapprocher des expériences concernant la réaction d'isomérisation L-Ribulose-5P $\rightleftharpoons$ D-xylulose-5-P (*cf.* BURMA et HORECKER, 1958 ; WOLIN et coll., 1958). Cette isomérisation, intéressant aussi le quatrième hydroxyle, n'est apparemment induite que par le ribulose.

8) *Variation de la teneur en enzymes, en rapport avec le mode de culture ou d'induction.*

Il est remarquable qu'au cours de l'adaptation aérobie au galactose, les points d'inflexion des différentes courbes se situent à peu près au même moment, comme si la cellule, ayant atteint la quantité d'enzymes nécessaire à une respiration optimum, cessait immédiatement de les fabriquer.

Cette observation est confirmée par l'ensemble des dosages d'enzymes qui ont été effectués au cours de ce travail. Il a été montré que, après induction (ou culture) en aérobiose et en présence de galactose, la quantité d'enzymes du galactose synthétisées atteint une valeur qui ensuite reste constante. La concentration d'enzymes atteinte est apparemment suffisante pour assurer un QO_2 optimum (identique à celui obtenu sur glucose), mais ne permet pas la fermentation du galactose à un taux opti-

imum (les Q_{O_2} atteints par de telles cultures représentant au maximum 50 p. 100 de la capacité fermentaire sur glucose).

Ce n'est qu'après culture en anaérobiose sur galactose, qu'il est possible d'atteindre des valeurs optima pour la fermentation anaérobie du galactose. Parallèlement, on constate que l'accroissement de la capacité fermentaire vis-à-vis du galactose correspond à l'acquisition d'une quantité d'enzymes du galactose proportionnellement supérieure aux valeurs atteintes en aérobiose.

Une restriction doit être faite à ce schéma en ce qui concerne l'UDPGal 4-épipimérase, dont la valeur maximum semble déjà être atteinte en aérobiose.

La phosphoglucumutase, par contre, élément constant du métabolisme des hydrates de carbone, varie parallèlement aux enzymes du métabolisme du galactose, au cours du passage galactose-AE, galactose ANA.

La phosphoglucumutase apparaît donc ici comme une enzyme dont la biosynthèse peut, dans certaines conditions, être soumise à des mécanismes intracellulaires de régulation qui permettent à une cellule, placée dans des conditions définies, d'ajuster son équipement enzymatique aux exigences des conditions extérieures. Ce point sera repris au cours de la discussion finale.

RÉSUMÉ

1° Le caractère adaptatif des quatre enzymes du métabolisme du galactose, chez *S. cerevisiae* et *S. fragilis*, a été mis en évidence. La quantité d'enzymes présente dans les cellules non-induites est, dans tous les cas, inférieure à 1 p. 100 de la quantité présente dans les cellules induites.

2° Les concentrations de galactose capables d'induire, et les cinétiques d'induction des différentes enzymes, ont été comparées, entre elles, et avec l'évolution de la capacité de respirer le galactose. Une corrélation satisfaisante a été mise en évidence concernant la galactose-perméase, la Gal-1-P G-1-P uridylyltransférase, l'UDPGal-4-épipimérase et le QO_2 -galactose, chez la souche CH-1.

3° L'induction des enzymes du métabolisme du galactose, chez la souche galactokinase-négative, a conduit à considérer le galactose comme l'inducteur polyvalent des quatre enzymes et à formuler l'hypothèse d'une « induction simultanée » de ces enzymes.

4° La spécificité du galactose en tant qu'inducteur a été mise en évidence.

5° Les caractéristiques de l'induction chez la souche galactose-perméase-négative, ont conduit à supposer que l'induction de la galactose-perméase pouvait être mise en relation avec un apport énergétique généralement limitant. Ceci pourrait expliquer la cinétique autocatalytique de l'induction de la « galactozymase » chez les souches portant l'allèle g_3 .

6° La durée de la phase de latence peut être réduite par un apport énergétique, sous forme de petites quantités de glucose. La signification de ces résultats a été discutée.

7° Il a pu être montré que, dans certaines conditions, la vitesse de l'adaptation enzymatique est modifiée, en fonction de la quantité de tryptophane ajoutée. Deux systèmes inductibles indépendants ont été comparés : enzymes de la respiration terminale, enzymes du métabolisme du galactose. Les vitesses de biosynthèse de ces

deux systèmes sont influencées de la même façon par la limitation en tryptophane, montrant ainsi l'absence de biosynthèse préférentielle, dans ces conditions.

8° La teneur en enzymes du métabolisme du galactose a été étudiée, en fonction du mode de culture ou d'induction. Il a pu être montré que le contenu enzymatique intracellulaire s'ajuste à des valeurs caractéristiques, selon que les levures sont adaptées à la respiration ou à la fermentation en présence de galactose.

La signification de ces résultats, en ce qui concerne les mécanismes de régulation métaboliques, a été discutée.

VII. — REMARQUES SUR LE CONTRÔLE GÉNÉTIQUE DE LA FORMATION DES ENZYMES DU MÉTABOLISME DU GALACTOSE CHEZ *S. CEREVISIAE*

La plupart des résultats expérimentaux obtenus au cours de ce travail ont été discutés en détail à la fin de chacun des trois chapitres principaux (voir 4.5, 5.4, et 6.10). Cette discussion finale sera consacrée à l'examen de quelques points particuliers concernant le mécanisme de l'induction des enzymes du métabolisme du galactose et son contrôle génétique, chez *S. cerevisiae*.

Il a été montré que l'utilisation du galactose chez la levure suit la même voie métabolique que celle qui a été décrite chez *E. coli* et chez l'homme (*cf.* KALCKAR et de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1959), et dont le résultat est l'épimérisation du galactose en glucose. Cette transformation s'opère sur des composés uridyliques de ces deux sucres et requiert l'intervention de 4 enzymes spécifiques. Trois de ces enzymes catalysent des transformations chimiques proprement dites ; ce sont : la galactokinase, la Gal-I-P/G-I-P uridylyltransférase et l'UDPGal-4-épimérase. Une quatrième enzyme, la galactose-perméase, mise en évidence au cours de ce travail, catalyse le transport actif du galactose et sa concentration à l'intérieur de la cellule.

On connaît jusqu'à maintenant trois gènes non liés (*cf.* HAWTHORNE, 1956) G_1 , G_2 , G_3 qui interviennent dans le contrôle du métabolisme du galactose chez *S. cerevisiae*. Il ressort des expériences qui ont été présentées ici que le gène G_2 contrôle la formation de la galactose-perméase, et que le gène G_1 contrôle celle de la galactokinase. Le rôle du gène G_3 n'a pas été précisé, mais il ne semble pas exercer un contrôle direct sur la capacité de former l'une quelconque des enzymes du métabolisme du galactose. Je reviendrai plus loin sur ce point.

Il a été montré également que les quatre enzymes du métabolisme du galactose sont inductibles. Les modalités de l'induction de ces enzymes dans différentes conditions (aérobie, anaérobie, cellules non-proliférantes ou cellules en croissance, etc.) ont été définies. La formation des enzymes du métabolisme du galactose est extrêmement réduite en absence de tryptophane exogène (nécessaire à la croissance de la souche utilisée) ce qui a permis de conclure que l'adaptation des levures à l'utilisation du galactose correspond à une biosynthèse induite des enzymes assurant le métabolisme de ce sucre. En présence de quantités limitantes de tryptophane il n'a pas été observé de synthèse protéique préférentielle : la biosynthèse de deux systèmes inductibles (enzymes de la respiration terminale et enzymes du métabolisme du galactose) est limitée de la même manière par les mêmes concentrations de tryptophane. Ces résultats montrent que la présence d'un facteur limitant de la synthèse protéique

limite l'activité des « sites formateurs d'enzymes » et ne semble pas en modifier le nombre (cf. 5.6).

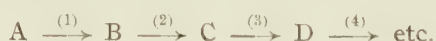
On voit que le présent travail a permis d'apporter un nouvel exemple d'une chaîne métabolique composée de quatre enzymes, toutes inductibles, et de définir avec précision certaines des caractéristiques de leur biosynthèse induite.

Les connaissances acquises au cours de cette étude, en ce qui concerne les propriétés biochimiques et adaptatives de ces enzymes et le contrôle héréditaire de leur biosynthèse chez *S. cerevisiae*, permettent maintenant d'envisager une étude génétique plus approfondie. Il est intéressant, en particulier, de connaître la nature du contrôle exercé par les gènes déjà connus (G_1 et G_2) sur la biosynthèse des deux enzymes impliquées, galactokinase et galactose-perméase, et le mode d'action du gène G_3 . Il serait également important de caractériser les gènes qui doivent vraisemblablement assurer le contrôle de la biosynthèse des deux autres enzymes, Gal-1-P G-1-P uridylyltransférase et UDPGal-4-épinérase pour lesquelles aucun mutant n'a jusqu'à présent été trouvé chez la levure.

L'étude de ce système présente de nombreux avantages : non seulement les quatre enzymes qui le composent sont inductibles, mais trois d'entre elles sont solubles et peuvent être dosées spectrophotométriquement par des méthodes sensibles et spécifiques. De plus, l'UDPGal-4-épinérase possède la propriété d'être fluorescente, propriété qui peut être dissociée de son activité enzymatique. L'obtention de mutants concernant la biosynthèse de cette enzyme devrait donc permettre l'étude de mutations ne modifiant que l'une des caractéristiques de cette protéine (fluorescence ou activité enzymatique).

Il est évident, d'autre part, que l'étude de ce système chez *S. cerevisiae* permet d'analyser d'une manière précise la ségrégation et les inter-actions des caractères envisagés.

L'étude de l'inductibilité des différentes enzymes du métabolisme du galactose, à l'aide des mutants qui ne métabolisent pas ce sucre, a permis de mettre en évidence un phénomène nouveau concernant le mécanisme d'induction de ces enzymes. Rappelons que selon le schéma de STANIER (1950) :



dans lequel A, B, C, D sont les substrats successifs d'une série d'enzymes (1), (2), (3), (4), le produit A est l'inducteur de l'enzyme (1), B l'inducteur de l'enzyme (2), etc. En l'absence de l'enzyme (1), le produit B n'étant pas formé, les enzymes (2), (3) et (4) ne devraient pas être induites. Cependant, chez le mutant galactokinase-négatif, les deux enzymes Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase et UDPGal-4-épinérase, sont induites en présence de galactose, bien que ce mutant ne forme ni galactose-1-phosphate, ni UDPGal (voir 5.2). Le galactose doit donc être considéré ici comme l'inducteur polyvalent de toutes les enzymes de cette chaîne métabolique⁽¹⁾. Ce mécanisme d'induction a été appelé « induction simultanée » (cf. 6.5 et de ROBICHON-SZULMAJSTER, 1957).

Cette conception est à rapprocher de la théorie actuelle de la « répression enzymatique » qui a déjà été évoquée au cours de l'introduction du chapitre 6.

⁽¹⁾ Le galactose est donc, par conséquent, l'inducteur « gratuit » d'au moins deux des enzymes du métabolisme du galactose, la Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase et l'UDPGal-4-épinérase, selon le mécanisme décrit par MONOD et COHEN (1952).

On sait, en effet, que la synthèse de certaines enzymes dites « constitutives » peut être inhibée sélectivement par la présence de « répresseurs exogènes ». Dans les exemples connus jusqu'à présent, un seul répresseur, le produit final de la chaîne métabolique ou un analogue structural de ce dernier, est capable de réprimer la biosynthèse de toutes les enzymes de cette chaîne (*cf.* MAGASANIK, 1959 pour revue). De même que dans le cas de l'induction simultanée des enzymes du métabolisme du galactose, il a pu être montré que la répression des enzymes de l'un de ces systèmes est indépendante de la présence d'un « bloc » génétique (GORINI et MAAS, 1957).

On sait, d'autre part, que l'action du répresseur exogène ne s'exerce qu'en présence d'un « gène répresseur » et que la mutation de ce gène affecte simultanément le caractère « inductible » ou « répressible » de l'ensemble des enzymes d'une chaîne métabolique (*cf.* JACOB et MONOD, 1959).

Il semble donc qu'un seul « répresseur endogène » (supposé être présent dans les souches inductibles, ou formé à partir du répresseur exogène chez les souches réprimées) peut bloquer le (ou les) site (s) de biosynthèse des enzymes appartenant à une même chaîne métabolique. Si l'on admet que l'inducteur agit en déplaçant le répresseur de ce (ou de ces) site (s), une seule espèce moléculaire d'inducteur par espèce moléculaire de répresseur doit donc être nécessaire.

L'inductibilité de plusieurs enzymes par un inducteur unique pourrait, par conséquent, être l'indication de la présence d'un système de « répression simultanée ».

Dans le cadre des travaux récents, concernant le contrôle génétique de la biosynthèse des enzymes (*cf.* JACOB et MONOD, 1959 et JACOB et coll., 1960), il est intéressant d'essayer de prévoir la nature possible du rôle des gènes déjà connus qui interviennent dans le déterminisme héréditaire de la capacité de métaboliser le galactose chez *S. cerevisiae*.

Je rappellerai tout d'abord, d'une manière très schématique, l'essentiel des résultats acquis par les auteurs précédemment cités, chez *E. coli* et sur des systèmes étroitement liés :

Une unité opérationnelle responsable de la biosynthèse des enzymes d'une chaîne métabolique (« opéron ») comprend une série de gènes responsables, chacun, de la synthèse de l'une des enzymes de la chaîne (« gènes structuraux ») dont l'activité est contrôlée par un seul « gène opérateur » et un « gène répresseur ». Les gènes structuraux et le gène opérateur correspondant sont étroitement liés, tandis que le gène répresseur peut ne pas être lié. Ce dernier gène est supposé être responsable de la synthèse d'une substance spécifique le « répresseur endogène » qui, en présence du répresseur exogène, est capable d'empêcher l'action du gène opérateur.

La formation des enzymes répressibles serait rendue possible, soit par l'abaissement de la concentration en répresseur (« dé-répression métabolique »), soit par une mutation affectant le gène répresseur ou le gène opérateur (« dé-répression génétique »). En effet, une mutation affectant la capacité de former le répresseur endogène conduit à la synthèse d'enzyme, même en présence du répresseur exogène. Ces mutants « constitutifs » sont de caractère récessif (*cf.* PARDEE, JACOB et MONOD, 1958). Une mutation provoquant l'insensibilité du gène opérateur envers le répresseur conduit également à une synthèse constitutive d'enzyme, laquelle est, cette fois, de caractère dominant (*cf.* JACOB et MONOD, 1959 ; JACOB et coll. 1960).

La formation des enzymes inductibles serait, de plus, soumise à la présence d'un inducteur capable d'antagoniser l'action du répresseur.

Les considérations qui vont suivre seront basées sur les faits expérimentaux qui viennent d'être résumés et seront étendues aux systèmes de la levure pour lesquels la plupart des enzymes constituant des séquences métaboliques ne sont pas liées génétiquement. La validité de cette extension est évidemment discutable. Elle permet toutefois de formuler un certain nombre d'hypothèses qui peuvent être soumises à vérification expérimentale.

En ce qui concerne les gènes impliqués dans le contrôle génétique du métabolisme du galactose chez *S. cerevisiae*, les caractéristiques des souches portant les allèles g_1 ou g_2 semblent correspondre à des mutations de gènes de structure $S \rightarrow s$ (protéine non-formée ou inactive). En effet, une seule enzyme est absente dans chaque génotype muté, et la synthèse des autres enzymes de la chaîne métabolique du galactose n'est apparemment pas perturbée.

Le cas du gène G_3 semble être différent. En effet, comme il a été montré au cours de ce travail, les quatre enzymes du métabolisme du galactose sont présentes, après induction, dans les souches portant l'allèle g_3 . Seule la cinétique d'induction semble donc être modifiée (caractère « slow », cf. 6.1).

Le mode d'adaptation des souches portant l'allèle récessif g_3 pourrait être attribué à un phénotype « super-réprimé ⁽¹⁾ ». Un tel phénotype peut à priori, être dû à deux événements génétiques différents : — *a*) mutation d'un gène hypothétique « R » qui forme une plus grande quantité de répresseur, ou un répresseur plus actif ; — *b*) mutation d'une structure génétique hypothétique du type « gène-opérateur » que j'appellerai « O », qui est devenu plus sensible au répresseur.

TABLEAU 22

Mutations pouvant affecter les systèmes génétiques qui contrôlent la biosynthèse des protéines

Gène muté	Nature de la mutation	Génotype résultant	Phénotype	Caractère
—	—	ROS	réprimé ou inductible	—
R (répresseur)	r (inactif) R^2 (plus actif)	r OS R^2 OS	constitutif super-réprimé	récessif dominant
O (opérateur)	O_c (insensible à R) O_r (plus sensible à R)	RO_cS RO_rS	constitutif super-réprimé	dominant récessif
S (structure)	s (protéine inactive) S_m (protéine formée même en présence de O + R) S_c (ne répond plus à O)	RO_s ROS_m ROS_c	négatif constitutif négatif	récessif dominant récessif

Le tableau 22 résume les différents types de mutations auxquelles on peut s'attendre au sein d'un système complexe « R-O-S ». On voit que la mutation $R \rightarrow R_2$ doit conduire à un phénotype super-réprimé de caractère dominant, tandis que la mutation $O \rightarrow O_c$ doit conduire à un phénotype super-réprimé de caractère récessif. Or, il est connu que le caractère « slow » correspondant à l'allèle g_3 (ancien G_3) est

(1) Il a été suggéré précédemment (voir 5.4. et 6.10) que l'aspect autocatalytique du phénomène pourrait également être expliqué par une limitation énergétique au niveau de la biosynthèse de la galactose-perméase.

récessif par rapport à G_3 . Il en résulte donc que si l'existence d'un système tel qu'on vient de le décrire doit être postulée dans le cas du contrôle génétique des enzymes du métabolisme du galactose, la mutation $G_3 \rightarrow g_3$ devrait donc être le résultat d'une mutation d'une structure génétique « O » et non du gène répresseur correspondant.

Il a déjà été signalé à plusieurs reprises que les gènes G_1 , G_2 et G_3 ne sont pas liés (cf. DOUGLAS et CONDIE, 1951 ; HAWTHORNE, 1950). De plus, des travaux récents de DOUGLAS (1960) ont permis de caractériser huit loci indépendants intervenant dans la capacité d'utiliser le galactose chez *S. cerevisiae*. La localisation génétique de certains d'entre eux a permis de montrer que G_1 , G_3 , G_4 et probablement G_5 sont situés sur des chromosomes différents (HAWTHORNE, expériences non publiées). Le rôle biochimique des gènes G_4 ... G_8 n'a pas encore été étudié.

On peut évidemment se poser plusieurs questions concernant un tel système : — 1^o Existe-t-il des gènes « O » contrôlant des gènes structuraux indépendants ? — 2^o Si oui, existe-t-il un seul gène « O » pour l'ensemble des gènes correspondant à une chaîne métabolique, malgré la dispersion du matériel génétique, ou bien devra-t-on invoquer un complexe « O-R » distinct pour chaque gène indépendant ?

Il est évident que la réponse à ces questions exige l'accumulation d'un plus grand nombre de mutants dans ce système, mutants structuraux, d'une part, correspondant aux deux autres enzymes du galactose, la Gal-1-P/G-1-P uridylyltransférase et l'UDPGal-4-épipimérase, dont la localisation génétique n'est pas connue, mutants constitutifs ou super-réprimés, d'autre part, correspondant aux différentes catégories prévisibles (voir tableau 22). Si le raisonnement « un inducteur — un répresseur » qui a été développé précédemment est valable, on pourrait s'attendre à trouver un seul complexe « O-R » pour l'ensemble du système galactose chez *S. cerevisiae*.

En dehors des caractéristiques principales concernant l'induction des différentes enzymes du métabolisme du galactose, chez *S. cerevisiae*, ce travail a fait ressortir la présence d'un système de régulation métabolique au niveau de l'une des enzymes-clé du métabolisme des glucides, la phosphoglucomutase.

On a vu qu'une teneur plus élevée en enzymes du galactose (cellules adaptées, cultivées en anaérobiose sur galactose), correspondant probablement à un apport plus important en glucose-1-phosphate, entraîne un accroissement d'environ trois fois, de la quantité de phosphoglucomutase présente normalement dans les cellules cultivées en présence de glucose. Le potentiel de synthèse de la phosphoglucomutase n'est donc pas totalement exprimé dans les cellules qui prolifèrent sur glucose.

La phosphoglucomutase n'est pas seulement indispensable à l'utilisation finale du glucose provenant de l'isomérisation du galactose. Elle se trouve également sur toutes les voies métaboliques qui conduisent à la formation de réserves hydrocarbonées. Un système de régulation métabolique s'exerçant au niveau de la phosphoglucomutase permettrait donc d'assurer un équilibre dynamique entre la formation de réserves hydracarbonées et l'utilisation à des fins énergétiques des hydrates de carbone.

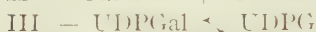
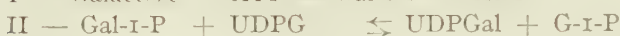
Les différents niveaux stables qui peuvent être atteints (selon les conditions de culture ou d'induction) aussi bien pour les enzymes du métabolisme du galactose que pour la phosphoglucomutase, montrent bien qu'il s'agit, à chaque fois, d'un équilibre interne dû à des rapports d'ordre quantitatif, probablement entre inducteur et répresseur.

VIII. — RÉSUMÉ GÉNÉRAL

L'étude chez les levures, et plus particulièrement chez *S. cerevisiae*, du métabolisme du galactose, de son contrôle héréditaire, et de la biosynthèse induite des enzymes impliquées dans ce métabolisme, a fait l'objet de ce travail :

Les principaux résultats acquis sont les suivants :

1° L'utilisation du galactose par *S. cerevisiae* et *S. fragilis* s'effectue par la voie métabolique de LELOIR-KALCKAR selon les réactions :



L'UDPG nécessaire à l'amorçage du système est formé au cours de la réaction suivante :



2° Les enzymes catalysant les réactions I, II et III sont présentes chez les levures adaptées au galactose, et absentes des levures non-adaptées. L'enzyme catalysant la réaction IV est au contraire toujours présente. Cette enzyme, G-I-P/PP uridyltransférase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase dont la concentration intracellulaire varie peu, ont été choisies comme enzymes de référence.

3° L'enzyme catalysant la réaction III, UDPGal-4-épimérase, a été purifiée 150 fois. L'enzyme native possède un spectre de fluorescence, et, contrairement à la même enzyme extraite de foie de mammifère, fonctionne sans addition de DPN. Toutefois, après différents traitements qui font disparaître la fluorescence, l'enzyme traitée exige l'addition de DPN pour son fonctionnement. Le composé lié à l'enzyme et responsable de sa fluorescence a été identifié au DPN.

4° Un schéma a été proposé permettant d'expliquer le mécanisme de la réaction d'épimérisation $\text{UDPGal} \rightleftharpoons \text{UDPG}$, sur la base d'un nouveau mécanisme d'oxydo-réduction dans lequel le noyau de l'uracile et le DPN acceptent conjointement un atome d'hydrogène du substrat, tandis qu'une compensation de charge se produit entre les deux noyaux.

5° Un système catalysant le transport actif du galactose et sa concentration à l'intérieur de la cellule est présent chez les levures adaptées ($g_1g_2g_3$). Les principales propriétés de ce système ont été décrites.

6° Trois gènes, actuellement identifiés, contrôlent le métabolisme du galactose chez *S. cerevisiae* : G_1 , G_2 , G_3 . Le gène G_1 contrôle la formation de la galactokinase, tandis que le gène G_2 contrôle celle de la galactose-perméase, précédemment décrite. Bien que le mode d'action du gène G_3 n'ait pas été précisé, certaines indications quant à son rôle possible ont été apportées et discutées.

7° Les cinétiques d'induction des différentes enzymes du métabolisme du galactose ont été comparées. Quelques-uns des paramètres de l'induction de ces enzymes ont été étudiés. Il a été montré que la formation des enzymes du métabolisme du galactose, chez *S. cerevisiae*, correspond, très vraisemblablement, à une synthèse *de novo* de ces protéines.

8° En présence de quantités limitantes de tryptophane (nécessaire à la croissance de la souche utilisée), la synthèse de deux systèmes inductibles différents a été comparée : enzymes de la respiration terminale, enzymes du métabolisme du galactose. Il n'a pas été observé de synthèse préférentielle de l'un des systèmes par rapport à l'autre. La signification de ces résultats a été discutée.

9° L'induction par le galactose des enzymes de son métabolisme, chez les souches galactokinase-négatives, a permis de mettre en évidence un phénomène d'*induction simultanée*. Les implications de ce phénomène, en ce qui concerne le mécanisme général de l'induction et de la répression ont été dégagées.

10° La teneur des cellules de levure en phosphoglucomutase peut être considérablement augmentée dans certaines conditions. L'importance métabolique de l'existence d'un système de régulation au niveau de la phosphoglucomutase a été discutée.

11° Quelques déductions ou prédictions concernant la nature du contrôle exercé par les gènes sur la biosynthèse des enzymes du métabolisme du galactose chez les levures, ont été présentées.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANDERSON L., LANDEL A. M. et DIEDRICH D. F., 1956. The galactose-glucose conversion in isotopic water. *Biochim. Biophys. Acta*, **22**, 573-575.
- ANET E. F. et REYNOLDS T. M., 1953. Isolation of l-quinic acid from the peach-fruit. *Nature*, **172**, 1188-1189.
- BATESON W., 1909. « *Mendel's principles of heredity* », Cambridge Univ. Press, London.
- BEADLE G. W. et EPHRUSSI B., 1936. The differentiation of eye pigments in *Drosophila* as studied by transplantation. *Genetics*, **21**, 225-247.
- BEADLE G. W. et EPHRUSSI B., 1937. Developement of eye colors in *Drosophila* : diffusible substances and their interrelations. *Genetics*, **22**, 76-86.
- BEADLE G. W., 1945. Biochemical genetics. *Chem. Rev.* **37**, 15-96.
- BOYER P. D. et THEORELL H., 1956. The change in reduced diphosphopyridine nucleotide (DPNH) fluorescence upon combination with liver alcohol dehydrogenase (ADH). *Acta Chem. Scand.*, **10**, 447-450.
- BOWMAN R. L., CAUFIELD P. A., et UDENFRIEND S., 1955. Spectrofluorometric assay in the visible and ultra-violet. *Science*, **122**, 32-33.
- BRITTEN R. J., ROBERTS R. B. et FRENCH E. F., 1955. Amino acid adsorption and protein synthesis in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **41**, 863-870.
- BURGER M., HEJMOVA L. et KLEINZELLER A., 1959. Transport of some mono and di-saccharides into yeast cells. *Biochem. J.*, **71**, 233-242.
- BURMA D. P. et HORECKER B. L., 1958. Pentose fermentation by *Lactobacillus plantarum*. IV : L-Ribulose-5-phosphate 4-epimerase. *J. Biol. Chem.*, **231**, 1053-1064.
- BURTON R. M., SODD M. A. et BRADY R. O., 1957. Incorporation of galactose into galactolipids of brain tissue. *Fed. Proc.*, **16**, 161.
- CABIB E., LELOIR L. F. et CARDINI C. E., 1953. Uridine diphosphate acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.*, **203**, 1055-1070.
- CABIB E. et LELOIR L. F., 1954. Guanosine diphosphate mannose. *J. Biol. Chem.*, **206**, 779-790.
- CAMPBELL A. M. et SPIEGELMAN S., 1956. The growth kinetics of elements necessary for galactozymase formation in « long-term adapting » yeasts. *C. R. Lab. Carlsberg, sér. physiol.*, **26**, 13-30.
- CAPUTTO R., LELOIR L. F., CARDINI C. E. et PALADINI A. C., 1950. Isolation of the coenzyme of the galactose phosphate-glucose phosphate transformation. *J. Biol. Chem.*, **184**, 333-350.
- CARDINI C. E., LELOIR L. F. et CHIBIBOGA J., 1955. The biosynthesis of sucrose. *J. Biol. Chem.*, **214**, 149-155.
- CIOTTI M. M., et KAPLAN N. O., 1957. Procedures for determination of pyridine nucleotides, in « *Methods in Enzymology* », Acad. Press, **3**, 890-899.
- COHEN G. N. et RICKENBERG H. V., 1956. Concentration spécifique réversible des aminoacides chez *Escherichia coli*. *Ann. Inst. Pasteur*, **91**, 693-720.
- COHEN G. N. et MONOD J., 1957. Bacterial permeases. *Bacteriol. Rev.*, **21**, 169-194.
- COHEN G. N., et JACOB F., 1959. Sur la répression de la synthèse des enzymes intervenant dans la formation du tryptophane chez *Escherichia coli*. *C. R. Acad. Sc.*, **248**, 3490-3492.
- COHEN-BAZIRE G. et JOLIT M., 1953. Isolement par sélection de mutants d'*Escherichia coli* synthétisant spontanément l'amylomaltase et la β -galactosidase. *Ann. Inst. Pasteur*, **84**, 1-9.
- COHN M., 1957. Contributions of studies on the β -galactosidase of *Escherichia coli* to our understanding of enzyme synthesis. *Bacteriol. Rev.*, **21**, 140-168.
- COHN M. et MONOD J., 1953. Specific inhibition and induction of bacterial enzyme synthesis, in « *Symp. Adaptation in microorganisms* », Cambridge Univ. Press, 132-149.

- COHN M., et TORRIANI A. M., 1953. The relationships in biosynthesis of the β -galactosidase and Pz-proteins in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **10**, 280-289.
- CRAMER F. B., et WOODWARD G. E., 1952. The 2-deoxy-D-glucose as an antagonist of glucose in yeast fermentation. *J. Franklin Inst.*, **253**, 354-360.
- DELEY J. et DOUDOROFF M., 1957. The metabolism of D-galactose in *Pseudomonas saccharophila*. *J. Biol. Chem.*, **227**, 745-757.
- DIENERT M., 1900. Sur la fermentation du galactose et sur l'accoutumance des levures à ce sucre. *Ann. Inst. Pasteur*, **14**, 139-189.
- DIXON M., 1943. « *Manometric methods* ». 2nd Ed., Mac Millan, New York.
- DOUDOROFF M., 1951. The problem of the « direct utilization » of disaccharides by certain microorganisms in « *Symp. on Phosphorus metabolism* », Mc Elroy W. D. et Glass B. ed., Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, p. 42-47.
- DOUDOROFF M., PALLERONI N. J., MAC GEE J. et O'HARA M., 1956. Metabolism of carbohydrates by *Pseudomonas saccharophila*. I. Oxidation of fructose by intact cells and crude cell-free preparations. *J. Bacteriol.*, **71**, 196-201.
- DOUGLAS H. G. et CONDIE F., 1954. The genetic control of galactose utilization in *Saccharomyces*. *J. Bacteriol.*, **68**, 662-670.
- DOUGLAS H. G., 1960. « *Abstracts from Research and Graduate Training Program in Genetics* ». Univ. of Washington, Seattle.
- DUCLAUX E., 1899. « *Traité de Microbiologie* », Masson ed., Paris.
- DUTTON G. J. et STOREY I. D. E., 1951. Glucuronide synthesis in liver homogenates. *Biochem. J.*, **48**, proc. 29.
- DUYSENS L. N. M. et KRONENBERG G. H. M., 1957. The fluorescence spectrum of the complex of reduced phosphopyridine nucleotide and alcohol dehydrogenase from yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, **26**, 437-438.
- EULER H. von et JANSSON B., 1927. The adaptation of fresh culture yeasts to galactose. *Z. Physiol. Chem.*, **169**, 226-234.
- FIESER L. F., et FIESER M., 1950. « *Organic chemistry* », Heath and Co. ed., Boston.
- FISCHER H. O. L., 1944. Chemical and biological relationships between hexoses and inositols. *Harvey Lect.*, **40**, 156.
- FRIDHANDLER L., 1959. Glucose metabolism in rabbit ova, morulae and blastocysts. *Fed. Proc.*, **18**, 48.
- FUKASAWA T. et NIKAIKO H., 1959. Formation of « protoplasts » in mutant strain of *Salmonella* induced by galactose. *Nature*, **183**, 1131-1132.
- GALZY P., et SLONIMSKI P. P., 1957. Evolution de la constitution enzymatique de la levure cultivée sur acide lactique ou sur glucose comme seule source de carbone. *C. R. Acad. Sc.*, **245**, 2556-2558.
- GANDER J. E., PETERSEN W. E. et BOYER P. D., 1956. On the mechanism of enzymatic synthesis of lactose. *Arch. Biochem. Biophys.*, **60**, 259-261.
- GARROD A. E., 1909. « *Inborn errors of metabolism* », Oxford.
- GINSBURG V. et NEUFELD E. F., 1957. Inhibition of phosphoglucomutase by galactose-1-phosphate : a possible factor in galactose toxicity. *Abst. Am. Chem. Soc.*, Meeting Sept.
- GINSBURG V., 1958. Formation of guanosine diphosphate fucose from guanosine diphosphate mannose. *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 4426.
- GORINI L. et MAAS W., 1957. The potential for the formation of a biosynthetic enzyme in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 208-210.
- HALVORSON H. O. et SPIEGELMAN S., 1952. The inhibition of enzyme formation by amino acid analogs. *J. Bacteriol.*, **64**, 207-221.
- HALVORSON H. O. et SPIEGELMAN S., 1953. The effect of free amino acid pool levels on the induced synthesis of enzymes. *J. Bacteriol.*, **65**, 490-504.
- HALVORSON H. O. et SPIEGELMAN S., 1953. Net utilization of free amino acids during the induced synthesis of maltosylase in yeast. *J. Bacteriol.*, **65**, 601-608.
- HALVORSON H. O., SPIEGELMAN S. et HINMAN R. L., 1955. The effect of tryptophan analogs on the induced synthesis of maltase and protein synthesis in yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, **55**, 512-525.
- HARDEN A. et NORRIS R. V., 1910. The fermentation of galactose by yeast and yeast juice. *Proc. Roy. Soc. London*, **82**, 645-649.
- HASSID W. Z., PUTMAN E. W. et GINSBURG V., 1956. Metabolism of galactose in *Canna* leaves and wheat seedlings. *Biochim. Biophys. Acta*, **20**, 17-22.
- HAWTHORNE D. C., 1956. The genetics of galactose fermentation in *Saccharomyces* hybrids. *C. R. Lab. Carlsberg, Sér. physiol.*, **26**, 149-160.
- HAWTHORNE D. C., expériences non publiées.
- HOAGLAND M. B., 1955. An enzymic mechanism for amino-acid activation in animal tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 288-289.
- HOGNESS D. S., COHN M. et MONOD J., 1955. Studies on the induced synthesis of β -galactosidase in *E. coli*. The kinetics and mechanism of sulfur incorporation. *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 99-116.
- HORECKER B. L., 1950. Triphosphopyridine nucleotide-cytochrome *c* reductase in liver. *J. Biol. Chem.*, **183**, 593-605.
- HUGHES D. E., 1951. A press for disrupting bacteria and other micro-organisms. *Brit. J. Exp. Pathol.*, **32**, 97-109.
- ISSELBACHER K. J. et AXELROD J., 1955. Enzymatic formation of corticosteroid glucuronides. *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 1070-1071.
- ISSELBACHER K. J., 1957. Evidence for an accessory pathway of galactose metabolism in mammalian liver. *Science*, **126**, 652-654.
- JACOB F. et MONOD J., 1950. Gènes de structure et gènes de régulation dans la biosynthèse des protéines. *C. R. Acad. Sc.*, **249**, 1282-1284.
- JACOB F., PERRIN D., SANCHEZ C. et MONOD J., 1960. L'OPERON : groupes de gènes à expression coordonnée par un opérateur. *C. R. Acad. Sc.*, **250**, 1727-1729.

- JERMYN M. A. et ISHERWOOD F. A., 1949. Improved separation of sugars on the paper partition chromatogram. *Biochem. J.*, **44**, 402-407.
- KALCKAR H. M. et CUTOLO E., 1952. Enzymic pyrophosphorolysis of uridine diphosphoglucosyl (UDPG), 1952. 2^{ème} Congr. Intern. Bioch., rés. comm., p. 260.
- KALCKAR H. M., BRAGANCA B. et MUNCH-PETERSEN A., 1953. Uridyltransferases and the formation of uridine diphosphoglucose. *Nature*, **172**, 1039.
- KALCKAR H. M. et MAXWELL E. S., 1950. Some considerations concerning the nature of the enzymic galactose-glucose conversion. *Biochim. Biophys. Acta.*, **22**, 588-589.
- KALCKAR H. M., ANDERSON E. P. et ISSELBACHER K., 1950. Galactosemia, a congenital defect in a nucleotide transferase : a preliminary report. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **42**, 49-51.
- KALCKAR H. M., 1953. Uridine diphospho galactose : metabolism, enzymology and biology. *Adv. Enzymol.*, **20**, 111-134.
- KALCKAR H. M. et de ROBICHON-SZULMAJSTER H., 1959. Quelques aspects du métabolisme du galactose chez les microorganismes et chez l'homme. *Bull. Soc. Ch. Biol.*, **41**, 1309-1328.
- KALCKAR H. M., KURAHASHI K. et JORDAN E., 1959. Hereditary defects in galactose metabolism in *Escherichia coli* mutants, I. Determination of enzyme activities. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **45**, 1776-1786.
- KARREMAN G., ISENBERG I. et SZENT-GYORGYI A., 1959. On the mechanism of action of chlorpromazine. *Science*, **130**, 1191-1192.
- KARRER P., 1950. « *Organic chemistry* », Elsevier Publ. Co., Amsterdam.
- KATTERMAN R. et SLONIMSKI P. P., 1950. Effet différentiel des analogues structuraux d'acides aminés sur la formation des enzymes respiratoires induite par l'oxygène. *C. R. Acad. Sc.*, **230**, 220-221.
- KENNEDY E. P. et WEISS S. B., 1954. Cytidine diphosphate choline : a new intermediate in lecithin biosynthesis. *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 250-251.
- KEPEZ A. et MONOD J., 1957. Étude du fonctionnement de la galactosidase perméase. *C. R. Acad. Sc.*, **244**, 803-811.
- KIRKMAN H. N. et BYNUM E., 1959. Enzymic evidence of a galactosemic trait in parents of galactosemic children. *Ann. Human Genetics*, **23**, 117-126.
- KLENOW H. et EMBERLAND R., 1955. The enzymatic reaction between Ribose-1-phosphate and Glucose-1-6 diphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **53**, 276-287.
- KORNBERG A., 1950. Enzymatic synthesis of triphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.*, **182**, 805-813.
- KOSTERLITZ H. W., 1943. The structure of the galactose-phosphate present in the liver during galactose assimilation. *Biochem. J.*, **37**, 318-321.
- KOWALSKY A. et KOSHLAND jr D. E., 1955. The mechanisms of the galactose-glucose interconversion in *Lactobacillus bulgaricus*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **22**, 575-577.
- KURAHASHI K., 1957. Enzyme formation in galactose-negative mutants of *Escherichia coli*. *Science*, **125**, 114-116.
- KURAHASHI K. et ANDERSON E. P., 1958. Galactose-1-phosphate uridyl transferase, its purification and application. *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 498-501.
- LEDERBERG J., 1951. Genetic studies with bacteria, in « *Genetics in the 20th century* », Mac Millan ed., New York, p. 263-283.
- LEDERBERG E., 1953. Fine structure of the Gal loci in *E. coli* K12. *Proc. 10th Intern. Congr. Genetics*, **2**, 161.
- LELOIR L. F., 1951a. The enzymatic transformation of uridine diphosphateglucose into a galactose derivative. *Arch. Biochem. Biophys.*, **33**, 186-190.
- LELOIR L. F., 1951b. The metabolism of hexosephosphates, in « *Phosphorus metabolism* », Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, p. 67-93.
- LELOIR L. F. et CABIB E., 1953. The enzymic synthesis of trehalose phosphate. *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 5445-5446.
- LELOIR L. F. et CARDINI C. E., 1955. The biosynthesis of sucrose phosphate. *J. Biol. Chem.*, **214**, 157-165.
- LEUPOLD U. et HOTTINGER H., 1954. Some data on segregation in *Saccharomyces*. *Heredity*, **8**, 243-258.
- LINDEGREN C. C. et LINDEGREN G., 1943. A new method for hybridizing yeast. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **29**, 306-308.
- LINDEGREN C. C., SPIEGELMAN S. et LINDEGREN G., 1944. Mendelian inheritance of adaptive enzymes in yeast. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **30**, 345-352.
- LINDEGREN C. C., 1945. Mendelian and cytoplasmic inheritance in yeasts. *Ann. Mo. Bot. Garden*, **32**, 107-123.
- LINDEGREN C. C., 1945. A new gene theory and an explanation of the phenomenon of dominance to Mendelian segregation of the cytogene, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **32**, 68-70.
- LINDEGREN C. C. et LINDEGREN G., 1945. The cytogene theory. *Cold Spring Harbor Symp.*, **11**, 115-129.
- LINDEGREN C. C. et LINDEGREN G., 1947. Mendelian inheritance of genes affecting vitamin synthesizing ability in *Saccharomyces*. *Ann. Mo. Bot. Garden*, **34**, 95-99.
- LINDEGREN C. C., 1949. « *The yeast cell. Its genetics and cytology* », Educ. Pub., St-Louis.
- LINDEGREN C. C. et PALLERONI N. J., 1952. Absence of pre-adaptive utilization of galactose by yeasts. *Nature*, **169**, 879.
- LINDENBERG A. B., MONIQUE A. et GUILLEMET R., 1949. La cryoscopie pratiquée sur le milieu de suspension de la levure et ses applications. *C. R. Acad. Sc.*, **229**, 774-775.
- LINNEVEAVER H. et BURK D., 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658.
- LODDER J. et KRIEGER-VAN RIJ N. J. W., 1952. « *The yeasts. A taxonomic study* », Interscience Pub., New York.
- LOEWUS F. A., WESTHEIMER F. H. et VENNESLAND B., 1953. Enzymatic synthesis of the enanthior-morphs of Ethanol-1-D-. *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 5018-5023.

- LOEWUS F. A., VENNESLAND B. et HARRIS D. L., 1955. The site of enzymatic hydrogen transfer in diphosphopyridine nucleotide. *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 3391-3393.
- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. et RANDALL R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- MAGASANIK B., MAGASANIK A. K., et NEIDHARDT F. G., 1959. Regulation of growth and composition of the bacterial cell, in « *Regulations of cell metabolism* », Ciba Found. Symp., p. 334-348.
- MANDELSTAM J., 1957. Turn-over of protein in starved bacteria and its relationship to the induced synthesis of enzyme. *Nature*, **179**, 1179.
- MAXWELL E. S., KALCKAR H. M. et BURTON R. M., 1955. Galacto-waldenase and the enzymic incorporation of galactose-1-phosphate in mammalian tissues. *Proc. 3rd Intern. Congr. Biochem.*, p. 168-169.
- MAXWELL E. S., 1956. Diphosphopyridine nucleotide, a cofactor for galacto-waldenase. *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 1074.
- MAXWELL E. S., 1957. The enzymic interconversion of uridine diphosphogalactose and uridine diphosphoglucose. *J. Biol. Chem.*, **229**, 139-151.
- MAXWELL E. S., de ROBICHON-SZULMAJSTER H. et KALCKAR H. M., 1958. Yeast uridine diphosphogalactose-4-epimerase, correlation between activity and fluorescence. *Arch. Biochem. Biophys.*, **78**, 407-415.
- MAXWELL E. S. et de ROBICHON-SZULMAJSTER H., 1960. Purification of uridine diphosphate galactose-4-epimerase from yeast, and the identification of protein-bound diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.*, **235**, 308-312.
- MILLS G. T., SMITH E. E. B. et LOCHHEAD A., 1957. The presence of uridine pyrophosphogalactose and uridine pyrophosphogalactose-4-epimerase in non-galactose adapted yeasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **25**, 521-528.
- MONOD J., 1942. « *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes* ». Hermann ed., Paris.
- MONOD J., COHEM-BAZIRE G., et COHN M., 1951. Sur la biosynthèse de la β -galactosidase (lactase), chez *Escherichia coli*. La spécificité de l'induction. *Biochim. Biophys. Acta*, **7**, 585-599.
- MONOD J. et COHN M., 1952. La biosynthèse induite des enzymes (adaptation enzymatique). *Adv. Enzymol.*, **13**, 67-116.
- MONOD J., PAPPENHEIMER A. M. jr. et COHEM-BAZIRE G., 1952. La cinétique de la biosynthèse de la β -galactosidase chez *Escherichia coli* considérée comme fonction de la croissance. *Biochim. Biophys. Acta*, **9**, 648-660.
- MONOD J., 1955. Données nouvelles sur la biosynthèse des enzymes. Adaptation enzymatique. *Exp. Ann. Bioch. Med.*, **17**, 195-211.
- MONOD J., 1956. Remarks on the mechanism of enzyme induction, in « *Enzymes, units of biological structure and function* », Acad. Press, New York, p. 7-28.
- MORSE M. L., LEDERBERG E. M. et LEDERBERG J., 1956. Transductional heterozygotes in *Escherichia coli*. *Genetics*, **41**, 758-779.
- MUNCH-PETERSEN A., KALCKAR H. M., CUTOLO E. et SMITH E. E. B., 1953. Uridyltransferases and the formation of uridine triphosphate. *Nature*, **172**, 1036-1037.
- MUNCH-PETERSEN A., 1954. Metabolism of uridine triphosphate in yeast. *Acta Chem. Scand.*, **8**, 1102-1103.
- MUNCH-PETERSEN A., KALCKAR H. M., et SMITH E. E. B., 1955. Kgl. Danske Videnskab. Selskab, *Biol. Med.*, **7**, 3.
- MUNDKUR B. D. et LINDEGREN C. C., 1949. An Analysis of long-term adaptation to galactose by *Saccharomyces*. *Amer. J. Biol.*, **36**, 722-727.
- NAJJAR V. A., 1948. The isolation and properties of phosphoglucumutase. *J. Biol. Chem.*, **175**, 281-290.
- NEIDHARDT F. C. et MAGASANIK B., 1957. Effect of mixtures of substrates on the biosynthesis of inducible enzymes in *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.*, **73**, 260-263.
- NELSON, N., 1955. Vhesis, Wash. Univ., Seattle.
- NEUFELD E. F., GINSBURG V., PUTMAN E. W., FANSHIER D. et HASSID W. Z., 1957. Formation and interconversion of sugar nucleotides by plant extracts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **69**, 602-616.
- NOSSAL P. M., 1953. A mechanical cell desintegrator. *Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sc.*, **31**, 583-590.
- OOSTON A. G., 1948. Interpretation of experiments on metabolic processes, using isotopic tracer elements. *Nature*, **162**, 963.
- PARDEE A. B., JACOB F. et MONOD J., 1958. Sur l'expression et le rôle des allèles inductibles et constitutif dans la synthèse de la β -galactosidase chez des zygotés d'*Escherichia coli*. *C. R. Acad. Sc.*, **246**, 3125-3126.
- PARDEE A. B., 1959. Mechanisms for control of enzyme synthesis and enzyme activity in bacteria, in « *Regulations of cell metabolism* », Ciba Found. Symp., p. 295-310.
- PARDEE A. B., JACOB F. et MONOD J., 1959. The genetic control and cytoplasmic expression of « inducibility » in the synthesis of β -galactosidase by *E. coli*. *J. Molec. Biol.*, **1**, 165-178.
- PASTEUR L., 1856. Note sur le sucre de lait. Lettre de M. Pasteur à M. Biot. *C. R. Acad. Sc.*, **42**, 34-35.
- PARTRIDGE S. M., 1948. Filter-paper partition chromatography of sugars. I-General description and the qualitative analysis of sugars in apple juice, egg white and foetal blood of sheep. *Biochem. J.*, **42**, 238-250.
- PARTRIDGE S. M., 1949. Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugar. *Nature*, **164**, 443.
- PETERSON E. A. et SOBER H. A., 1956. Chromatography of proteins I. Cellulose ion-exchange adsorbents. *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 751-755.
- PIGMAN W. W. et GOEPP R. M., 1948. « *Chemistry of the carbohydrates* », Acad. Press, New York.
- POLLOCK M. R. et PERRET C. J., 1951. The relation between fixation of penicillin sulphur and penicillinase adaptation in *Bacillus cereus*. *Brit. J. Exptl. Pathol.*, **32**, 387.
- POLLOCK M. R., 1953. Stages in enzyme adaptation, in « *Adaptation in microorganisms* », Cambridge Univ. Press., p. 150-183.
- POLLOCK M. R., 1956. An immunological study of the constitutive and the penicillin-induced penicilli-

- nases of *Bacillus cereus*, based on specific coenzymes neutralization by antibody. *J. Gen. Microbiol.*, **14**, 90-108.
- POLLOCK M. R., 1959. Induced formation of enzymes, in « *The enzymes* », 2nd Ed., Acad Press, New York, p. 619-680.
- PULLMAN M. E., SAN PIETRO A. et COLOWICK S. P., 1954. On the structure of reduced diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.*, **206**, 129-141.
- PULLMAN A. et PULLMAN B., 1959. Recherches sur la structure électronique des constituants cellulaires fondamentaux et des composés actifs en chimiothérapie anticancéreuse. VI. Les pyrimidines naturelles fondamentales. *Bull. Soc. Chim. France*, p. 594-597.
- PUTMAN E. W. et HASSID W. Z., 1957. Anomeric 1-dicyclohexylammonium phosphate esters of D-glucopyranose, D-galactopyranose, D-xylopyranose et L-arabinopyranose. *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 5057-5060.
- RACKER E. et KRIMSKY I., 1952. The mechanism of oxidation of aldehydes by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **198**, 731-743.
- RACKER E. et KRIMSKY I., 1958. Approaches to the mechanism of action of double-headed enzymes. *Fed. Proc.*, **17**, 1135-1141.
- REINER J. M. et SPIEGELMAN S., 1947. The preadaptive oxidation of galactose by yeast. *J. Gen. Physiol.*, **31**, 51-74.
- RENAMUS R., FAUCONNEAU G. et GUNTZ G., 1958. Isolement d'un nouveau nucléotide dans le lait de brebis : le guanosine-5-diphosphate fucose. *C. R. Acad. Sc.*, **246**, 2820-2823.
- RICKENBERG H. V. et LESTER G., 1955. The preferential synthesis of β -galactosidase in *E. coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **13**, 279-284.
- RICKENBERG H. V., COHEN G. N., BUTTIN G. et MONOD J., 1956. La galactoside-perméase d'*Escherichia coli*. *Ann. Inst. Pasteur*, **91**, 829-857.
- ROBICHON-SZULMAJSTER H., de, 1958. Induction of enzymes of the galactose pathway in mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Science*, **127**, 28-29.
- ROBICHON-SZULMAJSTER H., de 1958a. Uridine-diphosphogalactose-4-epimerase, an adaptive enzyme in *Saccharomyces fragilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **29**, 270-272.
- ROBICHON-SZULMAJSTER H. de et SOMLO M., 1959. Contrôle exercé par le tryptophane sur la biosynthèse de deux systèmes inducibles chez la levure. *C. R. Acad. Sc.*, **249**, 1583-1585.
- ROMAN H. L., HAWTHORNE D. C. et DOUGLAS H. C., 1951. Polyploidy in yeast and its bearing on the occurrence or irregular genetic ratios. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **37**, 79-84.
- SCHMID R., HAMMACKER L. et AXELROD J., 1957. The enzymatic formation of bilirubin glucuronide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **70**, 285-288.
- SELS A. A., 1958a. Recherches sur le mécanisme de l'induction des hémoprotéines pendant l'aération chez *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Intern. Physiol. Bioch.*, **66**, 127.
- SELS A. A., 1958b. Recherches sur la nature de l'initiateur d'une chaîne d'induction hémoprotéique pendant l'aération chez *Saccharomyces cerevisiae* : mutant « petite colonie ». *C. R. Soc. Biol.*, **152**, 1204-1205.
- SLONIMSKI P. P., 1953. « *Recherches sur la formation des enzymes respiratoires* ». Desoer ed., Liège.
- SLONIMSKI P. P., 1956. Adaptation respiratoire : Développement du système hémoprotéique induit par l'oxygène. *Proc. 3rd Int. Congr. Biochem.*, Acad. Press, New York, p. 242-252.
- SLONIMSKI P. P. et de ROBICHON-SZULMAJSTER H., 1957. Specific polyhydroxycompounds as cofactors of enzymic adaptation and its inheritance, in « *Drug resistance in microorganisms* », Ciba Found. Symp., p. 210-230.
- SLONIMSKI P. P. et TYSAROWSKI W., 1958. Sur l'existence de deux deshydrogénases lactiques chez la levure et sur la conversion, au sein de la cellule, de l'une en l'autre. *C. R. Acad. Sc.*, **246**, 1111-1114.
- SMITH E. E. B. et MILLS G. T., 1954. Uridine nucleotide compounds of liver. *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 386-400.
- SOBER E. A., GUTTER F. J., WYCKOFF M. M. et PETERSON E. A., 1956. Chromatography of proteins. II. Fractionation of serums protein on anion-exchange cellulose. *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 756-763.
- SOHNEN N. L. et COOLHAAS C., 1924. The fermentation of galactose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **9**, 131-144.
- SOLS A. et CRANE R. K., 1954. Substrate specificity of brain hexokinase. *J. Biol. Chem.*, **210**, 581-595.
- SOLS A., de la FUENTE F. et ALVARADO., 1958. Active transport of hexoses in yeasts. *Abstr. 4th Intern. Congr. Biochem.*, p. 78.
- SPIEGELMAN S., LINDEGREN C. C. et LINDEGREN G., 1945. Maintenance and increase of a genetic character by a substrate cytoplasmic interaction in the absence of the specific gene. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **31**, 95-102.
- SPIEGELMAN S., REINER J. M. et MORGAN I., 1947a. The apoenzymatic nature of adaptation to galactose fermentation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **12**, 113-125.
- SPIEGELMAN S., REINER J. M., et COHNBERG R., 1947b. The relation of enzymatic adaptation to the metabolism of endogenous and exogenous substrates. *J. Gen. Physiol.*, **31**, 27-49.
- SPIEGELMAN S., SUSSMAN R. R. et PINSKA E., 1950. On the cytoplasmic nature of « long-term adaptation » in yeast. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **36**, 591-606.
- SPIEGELMAN S., 1951. The particulate transmission of enzyme-forming capacity in yeast. *Cold Spring Harbor Symp.*, **16**, 87-98.
- SPIEGELMAN S., de LORENZO W. F., et CAMPBELL M., 1951. A single cell analysis of the transmission of enzyme-forming capacity in yeast. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **37**, 513-524.
- SPIEGELMAN S., et de LORENZO W. F., 1952. Substrate stabilization of enzyme forming capacity during the segregation of a heterozygote. *Proc. Nat. Acad. Sc.*, **38**, 583-592.
- SPIEGELMAN S. et HALVORSON H. O., 1953. The nature of the precursor in the induced synthesis of enzymes, in « *Adaptation in microorganisms* », Davies R. et Gale E. F. ed., Cambridge Univ. Press., p. 98-131.
- SPIEGELMAN S., 1955. The present status of the induced synthesis of enzymes. *Abstr. 3rd Intern. Cong. Biochem.*, p. 220.
- SPIEGELMAN S., HALVORSON H. O. et BEN-ISHAI R., 1955. Free amino acids and the enzyme forming

- mechanism, in «*Amino acid metabolism*», Mc ELROY W. D. et GLASS B. ed., Johns Hopkins Univ. Press Baltimore, p. 124-170.
- SPIEGELMAN S., 1956. On the nature of the enzyme-forming system, in «*Enzymes, units of biological structure and function*», Acad. Press, New-York, p. 67-89.
- STANIER R. Y., 1947. Simultaneous adaptation : a new technique for the study of metabolic pathways *J. Bacteriol.*, **54**, 339.
- STEPHENSON M. et YUDKIN J., 1936. Galactozymase considered as an adaptive enzyme. *Biochem. J.* **30**, 506-514.
- STIER T. J. S., SCALF R. E. et BROCKMAN M. C., 1950. An all-glass apparatus for the continuous cultivation of yeast under anaerobic conditions. *J. Bacteriol.*, **53**, 45-49.
- STOREY L. D. E. et DUTTON G. J., 1955. Uridine compounds in glucuronic acid metabolism-2. The isolation and structure of «*uridine-diphosphate-glucuronic acid*». *Biochem. J.*, **59**, 279-288.
- STROMINGER J. L., MAXWELL E. S., AXELROD J. et KALCKAR H. M., 1957. Enzymatic formation of uridine diphosphoglucuronic acid. *J. Biol. Chem.*, **224**, 79-90.
- STROMINGER, J. L., 1960. Monocleotide acid anhydrides and related compounds as intermediates in metabolic reactions. *Physiol. Rev.* **40**, 55-111
- SENT-GYORGYI A., 1957. «*Bioenergetics*», Acad Press, New York.
- TANRET C., 1902. Sur l'extraction des sucres réducteurs (monoses). *Bull. Soc. Chim. France*, **27**, (3^{ème} série) 392-398
- TAYLOR E. S., 1947. The assimilation of amino-acids by bacteria-3. Concentration of free aminoacids in the internal environment of various bacteria and yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, **1**, 86.
- TREVELYAN W. E., 1958. Synthesis and degradation of cellular carbohydrates by yeasts, in «*The chemistry and biology of yeasts*», COOK A. H. ed., Acad. Press, New York, p. 369-436.
- TRUCCO R. E., CAPUTO R., LELOIR L. F. et MITTELMAN N., 1948. Galactokinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **18**, 137-146.
- UMBREIT W. W., BURRIS R. H. et STAUFFER J. F., 1949. «*Manometric techniques and tissues metabolism*», Burgess Pub. Co, Minneapolis.
- VELICK S. F., 1953. Coenzyme binding and the thiol groups of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **203**, 563-573.
- VENNESLAND B. et WESTHEIMER F. H., 1954. Hydrogen transport and steric specificity in reactions catalyzed by pyridine nucleotide dehydrogenases, in «*Mechanisms of enzyme action*», John Hopkins Univ. Press, Baltimore, p. 357-388.
- VENNESLAND B., 1958. Stereospecificity of hydrogen transfer in pyridine nucleotide dehydrogenase reaction. *Fed. Proc.*, **17**, 1150-1157.
- VOGEL H. J., 1957. Repression and induction as control mechanisms of enzyme biogenesis. The «*adaptive*» formation of acetylornithinase, in «*The chemical basis of heredity*», Johns Hopkins Univ. Press, p. 276-296
- WAJZER J., 1949. Test spectrophotométrique de l'hexokinase. *C. R. Acad. Sc.*, **229**, 1270-1272.
- WARAVDEKAR V. S. et SASLAW L. D., 1957. A method of estimation of 2-deoxyribose. *Biochim. Biophys. Acta.*, **24**, 439.
- WESTHEIMER F. H., FISHER H. F., CONN E. E. et VENNESLAND B., 1951. The enzymatic transfer of hydrogen from alcohol to DPN. *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 2403.
- WESTHEIMER F. H., 1954. «*One electron*» and «*two-electrons*» oxidation-reduction reactions in inorganic and organic chemistry, in «*Mechanism of enzyme action*», Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore p. 321-356.
- WHITE J., 1954. «*Yeast technology*», CHAPMAN and HALL ed., London.
- WICK A. N., DRURY D. R., NAKADA H. I. et WOLFE J. B., 1957. Localization of the primary metabolic block produced by 2-deoxyglucose. *J. Biol. Chem.*, **224**, 963-969.
- WILLSTATTER R. et ROHDEWALD M., 1937. Über die erste Phase der Gärung durch Hefe. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **247**, 269-280.
- WINER A. D., SCHWERT G. W. et MILLAR D. B. S., 1959. Fluorometric measurements of the complex of enzyme and reduced diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.*, **234**, 1149-1155.
- WINGE O. et LAUSTEN O., 1937. On two types of spore germination, and on genetic segregation in *Saccharomyces*, demonstrated through single-spore cultures. *C. R. Lab. Carlsberg, Sér. physiol.*, **22**, 99-116.
- WINGE O. et LAUSTEN O., 1938. Artificial species hybridization in yeast. *C. R. Lab. Carlsberg, Sér. physiol.*, **22**, 235-244.
- WINGE O. et LAUSTEN O., 1939. On 14 new yeast types, produced by hybridization. *C. R. Lab. Carlsberg, sér. physiol.*, **22**, 337.
- WINGE O. et ROBERTS C., 1948. Inheritance of enzymatic characters in yeasts and the phenomenon of long-term adaptation. *C. R. Lab. Carlsberg, sér. physiol.*, **24**, 263-315.
- WINGE O. et ROBERTS C., 1958. Yeast genetics, in «*The chemistry and biology of yeasts*», COOK A. H. ed., Acad. Press, New York, p. 123-156.
- WINZLER R. J., 1940. The oxidation and assimilation of acetate by baker's yeast. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **15**, 343-354.
- WOLIN M. J., SIMPSON F. J. et WOOD W. A., 1958. Degradation of L-arabinose by *Aerobacter aerogenes*. *J. Biol. Chem.*, **232**, 559-575.
- WOOD H. G., SCHAMBYE P. et PELTERS G. J., 1957. Lactose synthesis. II. The distribution of ¹⁴C in lactose of milk from the perfused isolated cow udder. *J. Biol. Chem.*, **226**, 1023-1034.
- WOODWARD G. E. et HUDSON M. T., 1954. The effect of 2-deoxy-D-glucose on glycolysis and respiration of tumors and normal tissues. *Cancer Res.*, **14**, 599-605.
- YUDKIN J., 1938. Enzyme variation in microorganisms. *Biol. Rev.*, **13**, 93.
- ZINDER N. D. et LEDERBERG J., 1952. Genetic exchange in *Salmonella*. *J. Bacteriol.*, **64**, 679-699.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

L'AMORÇAGE DANS LES SYNTHÈSES BIOCHIMIQUES, EN RAPPORT AVEC LE PROBLÈME D'AUTOREPRODUCTION.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 13 juin 1960.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PÉRÈS

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH

Imprimerie BUSSIÈRE à Saint-Amand (Cher), France. — 19-6-1961.

Dépôt légal : 2^e trim. 1961. N^o d'impression : 557.

